

---

# **Fluoreszenzmikroskopie mit zweidimensionaler strukturierter Beleuchtung**

**Martin Schropp**

---



München 2018



---

# **Fluoreszenzmikroskopie mit zweidimensionaler strukturierter Beleuchtung**

**Martin Schropp**

---

Dissertation  
an der Fakultät für Physik  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

vorgelegt von  
Martin Schropp  
aus München

München, den 30.11.2018

Erstgutachter: Prof. Dr. Ralf Jungmann

Zweitgutachter: Prof. Dr. Rainer Uhl

Tag der mündlichen Prüfung: 14.01.2019

# Zusammenfassung

Die laterale und axiale Auflösung eines Fluoreszenzmikroskops mit Weitfeld-Anregung wird durch die Detektion von Fluoreszenzlicht, das aus Ebenen ober- und unterhalb der Fokusebene (Ausserfokus-Bereich) des Mikroskopobjektivs stammt verschlechtert. Aufgrund der Vermischung des detektierten Signals aus dem Fokus mit dem defokussierten Signal aus dem Ausserfokus-Bereich, sind dreidimensionale Darstellungen von Zellen meist nicht möglich. In der *konfokalen* Mikroskopie wird das Ausserfokus-Signal durch Blenden daran gehindert auf den Detektor zu gelangen, wodurch dieses Problem umgangen wird.

Eine Alternative zur konfokalen Mikroskopie ist die Mikroskopie mit „*strukturierter Beleuchtung*“ (kurz SIM<sup>1</sup>). Hierbei wird der Fokus-Bereich des Objektivs durch eine (z.B. periodisch) modulierte Anregungsintensität markiert und die gesamte emittierte Fluoreszenz detektiert. Um ein (*quasikonfokales*) Bild des Objekts zu erhalten, müssen mehrere Bilder aufgenommen werden, wobei das Intensitätsprofil der Anregung zwischen den Aufnahmen verschoben wird. Im Vergleich zum konfokalen Mikroskop, bietet SIM eine bessere Unterdrückung des Ausserfokus-Signals (Konfokalität). Allerdings geht das Rauschen des Ausserfokus-Signals in das quasikonfokale Bild mit ein, so dass SIM nur mit dünnen Proben gut funktioniert (üblicherweise wenige  $\mu\text{m}$ ).

Darüber hinaus ist es möglich die Auflösung des Mikroskops durch SIM über die klassische Auflösungsgrenze hinaus zu verbessern (Superresolution-SIM). Diese Methode basiert auf dem Moiré-Effekt. Für dieses Verfahren wird üblicherweise ein (Intensitäts- bzw. Phasen-) Strichgitter zur Erzeugung einer strukturierten Anregungsintensität benutzt, um die laterale Auflösung zunächst in einer Richtung zu verbessern. Um eine Auflösungssteigerung in zwei Dimensionen zu erreichen, müssen mehrere Serien verschobener Bilder, für mindestens drei

---

<sup>1</sup>engl. Structured Illumination Microscopy

Orientierungen des Linienmusters aufgenommen werden. Üblicherweise wird hierbei die Frequenzrichtung des Linienmusters unter null, 120 und 240 Grad orientiert. Auch hier sollte die Probendicke typischerweise nicht mehr als wenige  $\mu\text{m}$  betragen.

In dieser Arbeit wurde einerseits die Verwendung zweidimensionaler Muster sowohl für quasikonfokale SIM als auch für Superresolution SIM untersucht. In beiden Fällen reicht es aus, das jeweilige (Intensitäts-) Muster in der Probe entlang einer Raumrichtung zu verschieben um alle für die Auswertung notwendigen Rohbilder zu erzeugen. Bei der quasikonfokalen SIM erhält man mit zweidimensionalen Mustern ein weniger richtungsabhängiges Intensitätsfrequenzspektrum der quasikonfokalen Bilder. Im Fall der Superresolution SIM ergeben sich durch die Verwendung hexagonaler Muster Vereinfachungen am Experiment und in der Auswertung: Da hexagonale Muster Frequenzen mehreren Richtungen enthalten, ist hier keine Drehung des Musters bei der Aufnahme der Rohbilder notwendig. Dadurch können für die Auswertung kritische Parameter bereits vor der Messung kalibriert werden, statt in jeder Messung direkt aus den Messdaten ermittelt werden zu müssen.

Zusätzlich wurde die strukturierte Beleuchtung mit *linienkonfokaler* Anregung und Detektion kombiniert, um das detektierte Ausserfokus-Signal zu reduzieren. Dadurch wird das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verbessert und die Anwendung von SIM auf dickere Proben ermöglicht.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>v</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole . . . . .	7
<b>2. Optische Grundlagen</b>	<b>9</b>
2.1. Optische Abbildungen . . . . .	9
2.2. Auflösungsvermögen eines Mikroskops . . . . .	13
2.2.1. Kohärenz . . . . .	13
2.2.2. Inkohärente Abbildung . . . . .	15
2.2.3. Kohärente Abbildung . . . . .	16
2.3. Defokus . . . . .	18
2.3.1. Beschreibung des Defokus mit der Fehlerfunktion . . . . .	21
2.4. Optische Transferfunktion . . . . .	23
2.4.1. Kohärente optische Transferfunktion . . . . .	23
2.4.2. Inkohärente Optische Transferfunktion . . . . .	24
2.4.3. Beschreibung der defokussierten OTF mit der Fehlerfunktion . . . . .	26
2.4.4. Kontrastverlauf bei inkohärenter Abbildung periodischer Muster . . . . .	27
2.4.5. Kohärente Abbildung periodischer Muster . . . . .	28
2.4.6. Polarisation . . . . .	32
2.4.7. Die Dreidimensionale OTF . . . . .	33
<b>3. Fluoreszenzmikroskopie</b>	<b>37</b>
3.1. Konfokale Mikroskopie . . . . .	40
3.1.1. Die Konfokalitätsfunktion . . . . .	42
3.2. Strukturierte Beleuchtung mit Liniengittern . . . . .	44
3.3. Auflösungssteigerung durch Strukturierte Beleuchtung . . . . .	53

3.3.1.	Auflösungssteigerung in zwei Dimensionen . . . . .	53
3.3.2.	Überlagerung der Frequenzbänder . . . . .	60
3.3.3.	Auflösungssteigerung in drei Dimensionen . . . . .	63
<b>4.</b>	<b>Strukturierte Beleuchtung mit zweidimensionalen Mustern</b>	<b>69</b>
4.1.	SIM mit Schachbrettmustern . . . . .	71
4.2.	SIM mit hexagonalen Mustern . . . . .	77
4.2.1.	Quasikonfokale hexagonale SIM . . . . .	79
4.2.2.	Richtungsabhängigkeit des quasikonfokalen Signals . . . . .	82
4.2.3.	Hexagonale SR-SIM in 2D . . . . .	82
4.2.4.	Hexagonale SR-SIM in 3D . . . . .	84
4.3.	Fehlerfortpflanzung bei quasikonfokaler 2D-SIM . . . . .	86
4.3.1.	Vergleich der SNR für Linien- und Hexagonmuster bei inkohärenter quasikonfokaler SIM . . . . .	87
4.4.	Fehlerfortpflanzung bei Superresolution SIM . . . . .	91
4.4.1.	Vergleich des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses für Liniengitter- und Hexagonale SR-SIM . . . . .	92
4.5.	Kombination mit Spaltkonfokaler Mikroskopie . . . . .	96
4.5.1.	Kohärente Bildentstehung periodischer Muster . . . . .	97
4.5.2.	Minimale Breite der Anregungslinie . . . . .	98
4.5.3.	Konfokalität bei hexagonaler linienkonfokaler SIM . . . . .	101
<b>5.</b>	<b>Messungen – Quasikonfokale SIM</b>	<b>105</b>
5.1.	SIM mit Schachbrettmuster . . . . .	105
5.2.	SIM mit Hexagonmuster . . . . .	105
5.2.1.	Richtungsabhängigkeit des quasikonfokalen Signals . . . . .	107
5.2.2.	Messung der Konfokalitätsfunktion . . . . .	107
<b>6.</b>	<b>Messungen – Hexagonale Linienkonfokale Superresolution-SIM</b>	<b>113</b>
6.1.	Auflösungssteigerung - qualitativ . . . . .	116
6.2.	Auflösungssteigerung - quantitativ . . . . .	120
6.2.1.	Nanoruler . . . . .	120
6.2.2.	Beads . . . . .	122
6.3.	Messungen mit Dicken Proben . . . . .	129
6.3.1.	Vergleich mit dem OMX Mikroskop . . . . .	132



<b>7. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen</b>	<b>135</b>
<b>A. Grundlegende Definitionen</b>	<b>139</b>
<b>B. Die SIM-Konfokalitätsfunktion</b>	<b>147</b>
<b>C. Herleitung der PSF eines Laserscanning-Mikroskops</b>	<b>149</b>
C.1. Laserscanning mit punktförmiger Anregung . . . . .	149
C.2. PSF für ein linienkonfokales Mikroskop . . . . .	152
<b>D. Herleitung der Gleichungen (3.13), (4.24) und (4.45)</b>	<b>155</b>
D.1. Reelle Auswertung für quasikonfokale SIM mit Linienmuster . . . . .	155
D.2. Reelle Auswertung für quasikonfokale SIM mit Schachbrettmuster . . . . .	156
D.3. Reelle Auswertung für quasikonfokale SIM mit Hexagonmuster . . . . .	158
<b>E. Fehlerfortpflanzung bei quasikonfokaler SIM</b>	<b>159</b>
E.1. Fehlerfortpflanzung mit Orientierungsfehler . . . . .	162
<b>F. Fehlerfortpflanzung bei Superresolution SIM</b>	<b>167</b>
F.1. Varianz der Frequenzbänder . . . . .	167
F.2. Varianz und SNR des rekonstruierten Objekts . . . . .	170
<b>G. Die optimale Überlagerung der Frequenzbänder bei der SR-SIM</b>	<b>171</b>
<b>H. Schachbrett-SIM mit mehr als fünf Unbekannten</b>	<b>173</b>
<b>I. Hexagonale SIM mit mehr als sieben Unbekannten</b>	<b>179</b>
I.1. Symmetriebetrachtungen . . . . .	183
<b>J. Hexagonale Phasenmuster</b>	<b>187</b>
J.1. Berechnung der modulierten Amplitude . . . . .	187
J.2. Phasenmuster mit beliebigem Phasensprung $\Delta\Phi$ . . . . .	191
J.3. Abschätzung der Fokusverschiebung durch Fehler des Phasenmusters . . . . .	194
<b>K. Polarisation</b>	<b>197</b>
K.1. Berechnung der Feldstärkevektoren für die hexagonalen Beugungsordnungen	197
K.2. Berechnung der Musterintensität in der Probe . . . . .	200
K.3. Anteile des Intensitätsspektrums . . . . .	201

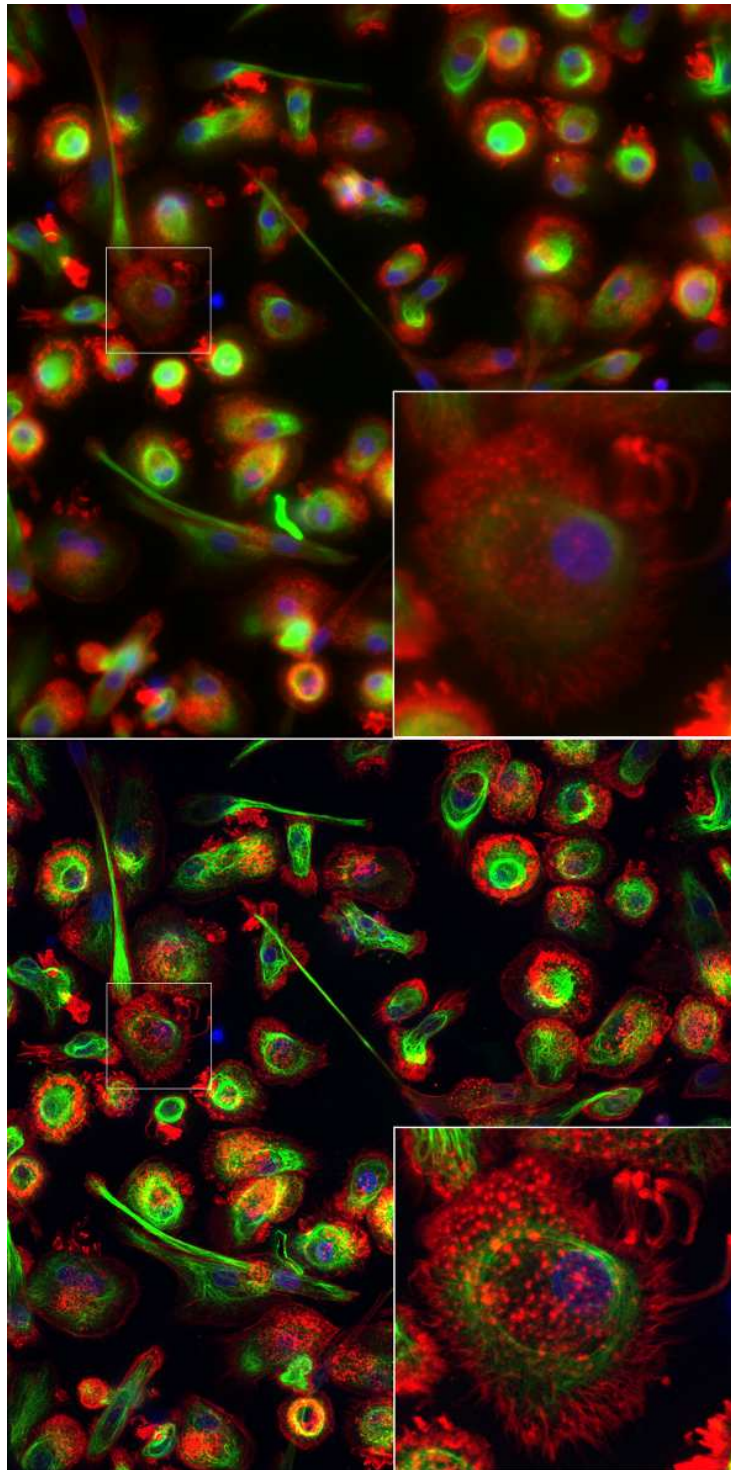
K.4. Lineare Polarisisation . . . . .	205
K.5. Z-Abhängigkeit der Koeffizienten $c_j$ . . . . .	207
K.6. Zirkulare Polarisisation . . . . .	210
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>213</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>217</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>219</b>

# 1. Einleitung

Die Fluoreszenzmikroskopie ist heute ein wichtiges Werkzeug in der biologischen und medizinischen Forschung. Einerseits erlaubt diese Technik die Beobachtung einzelner Bestandteile von Zellen, die von Natur aus fluoreszieren; andererseits können einzelne Zellbestandteile durch bestimmte Farbstoffe wie z.B. fluoreszente Proteine sichtbar gemacht werden, [Shi62, Tsi88, War05, Sha04, Che85] bzw. die Proteine in der Zelle lokalisiert werden [Tsi89, Cub95]. Da ein Teil der Anregungsenergie z.B. an Schwingungen der Farbstoffmoleküle verloren geht, ist die Emissionswellenlänge bei der Fluoreszenz immer etwas größer als die Anregungswellenlänge. Dieses Phänomen wird als *Stokes-Shift* bezeichnet [Sto52, Lak06] und ermöglicht es, das Anregungslicht – z.B. im Fall eines Durchlichtmikroskops – mit optischen Filtern vom Emissionslicht zu trennen.

Seit der Erfindung dichroitischer Spiegel werden Fluoreszenzmikroskope meist als *Auflichtmikroskope* gebaut, d.h. die Probe wird durch dasselbe Objektiv angeregt, durch das auch die fluoreszente Emission z.B. auf eine Kamera abgebildet wird. Die Probe wird hierbei durch das Anregungslicht möglichst gleichmäßig ausgeleuchtet. Man spricht in diesem Fall auch von *Epifluoreszenzmikroskopie*.

Ein großes Problem bei der Epifluoreszenzmikroskopie ist, dass bei gleichmäßiger Ausleuchtung der Probe, nicht nur die Ebene im Fokus des Objektivs, sondern auch alle Ebenen ober- bzw. unterhalb der Fokusebene (Ausserfokus) zur Fluoreszenz angeregt werden. Die Emission aus diesen Ebenen wird als *Ausserfokus-Emission* bezeichnet und gelangt aufgrund der Energieerhaltung mit dem Signal aus der Fokusebene auf die Kamera [Ino90]. Die Ausserfokus-Emission trägt aufgrund der Defokussierung (siehe hierzu z.B. Abschnitt 2.3) hauptsächlich als schwach modulierte Hintergrundsignal zum Bild bei und reduziert so den Kontrast im gemessenen Bild (siehe Abbildung 1.1). Je nach Probendicke bzw. Farbstoffkonzentration im Ausserfokusbereich fällt dieser Effekt mehr oder weniger stark aus.



**Abb. 1.1.:** Vergleich zwischen einer Epifluoreszenzmikroskopie (EPI) Aufnahme (oben) und einer quasikonfokalen Aufnahme mit hexagonaler SIM (unten). Quelle: Dr. Cora Thiel, Universität Magdeburg/Universität Zürich. Die Abmessungen des vergrößerten Ausschnitts rechts unten betragen jeweils etwa  $60\mu\text{m}$ . Die Probe besteht aus menschlichen Makrophagen und wurden mit 2% Paraformaldehyd fixiert und zelluläre Strukturen folgendermaßen gefärbt: Kern (DAPI, 405nm), Vimentin Cytoskelett (Antikörper anti-Vimentin direkt gelabelt mit Alexa 488), Aktin Cytoskelett (Farbstoff SiRActin). Man sieht, wie das Ausserfokussignal die Auflösung und Kontraste im EPI Bild deutlich verschlechtert.

---

Eine Möglichkeit das unerwünschte Ausserfokus-Signal im gemessenen Bild zu reduzieren ist die sogenannte *konfokale* Mikroskopie [Min61, Cla79]. Hierbei wird die Probe nicht gleichmäßig, sondern z.B. punktförmig (oder auch später in Form einer Linie bzw. Zeile [Bae70, Dus06, Hig15, Lar11]) angeregt. Der angeregte punktförmige Bereich wird dann auf eine kreisförmige Blende (bzw. im Fall einer Linie auf einen Spalt) abgebildet, wodurch ein Großteil des Ausserfokus-Signals nicht auf den Detektor/die Kamera gelangt. Um ein vollständiges Bild des mikroskopischen Objekts zu erhalten, muss der Messbereich durch die punkt- bzw. linienförmige Anregung abgetastet werden.

Eine Alternative zu den konfokalen Verfahren ist die Mikroskopie mit *strukturierter Beleuchtung* (kurz SIM<sup>1</sup> [Luk63, Mor92]). Hierbei wird die Probe mit einer räumlich (z.B. periodisch) modulierten Intensität angeregt, welche z.B. durch Abbildung eines Musters auf die Probe erzeugt wird. Der Kontrast der Musterintensität nimmt – falls die Periode des Musters geeignet gewählt wird – in axialer Richtung rasch ab. Daher kann der Fokusbereich des Mikroskopobjektivs durch die Modulation des Musters in der Probe markiert werden. Um ein konfokales Bild der Probe zu erhalten, werden eine Reihe von Rohbildern aufgenommen, wobei das Bild des Musters von einem zum nächsten Rohbild (z.B. über einen Scanspiegel) in der Probe verschoben wird.

Im Gegensatz zu rein konfokalen Verfahren wird bei der SIM auch das Ausserfokus-Signal detektiert, welches später rechnerisch entfernt wird. Dadurch trägt das Rauschen der Ausserfokus-Detektion auch zum Rauschen im ausgewerteten Bild bei, d.h. mit zunehmender Probendicke verschlechtert sich das Signal-Rausch-Verhältnis des SIM Bildes. Die mikroskopierbare Probendicke bei SIM liegt daher unter der von rein konfokalen Verfahren. Die Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung wird auch als *quasikonfokal* bezeichnet [Hei06a].

Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung bietet außerdem noch die Möglichkeit die räumliche Auflösung eines Mikroskops über die Auflösung einer beugungsbegrenzten Optik hinaus zu steigern (Superresolution-SIM). Hierbei wird der *Moiré-Effekt*, der bei der Überlagerung der periodisch modulierten Musterintensität und den Strukturen der Probe [Nyq28, Kot33] entsteht ausgenutzt, um eine Steigerung der räumliche Auflösung des Mikroskops – zunächst in Richtung der Musterfrequenz – um einen Faktor 2 über die beugungsbegrenzte Auflösung hinaus zu ermöglichen [Luk63, Luk66, Mor92]. Werden bei der strukturierten Beleuchtung als Muster Liniengitter verwendet, müssen Rohbilder unter mindestens drei verschiedenen

---

<sup>1</sup>engl. Structured Illumination Microscopy

Orientierungen des Liniengitters aufgenommen werden, um eine gleichmäßige laterale Auflösungssteigerung in allen Richtungen des mikroskopischen Bildes zu erreichen. In jeder Orientierung des Musters muss dementsprechend ein Satz an Rohbildern aufgenommen werden.

Wird bei der SIM nicht nur eine Ebene der Probe vermessen, sondern ein Stapel an  $z$ -Ebenen aufgenommen, so ist es bei kohärenter Abbildung des Musters auf die Probe auch möglich, zusätzlich zur lateralen Auflösung auch die axiale ( $z$ ) Auflösung des Mikroskops um etwa einen Faktor 2 zu verbessern. Da die Orientierung des Musters für alle Ebenen eines  $z$ -Stapels konstant sein sollte, wird hier üblicherweise ein separater  $z$ -Stapel für jede Orientierung des Musters aufgenommen. Es ist daher notwendig insgesamt mindestens drei  $z$ -Stapel zur Messung eines 3D-Volumens aufzunehmen.

Einerseits kann dies dazu führen, dass die Rohbilder für die verschiedenen Musterorientierungen nicht dasselbe Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufweisen, da der Fluoreszenzfarbstoff im Laufe der Bildaufnahmen ausbleicht. Andererseits können Fehler der relativen  $z$ -Positionen gerade bei  $z$ -Stapeln mit vielen Ebenen zu Artefakten in den ausgewerteten Superresolution Bildern führen.

Auch wenn die erreichbare Auflösungssteigerung bei der SIM deutlich kleiner ist, als bei anderen Verfahren wie z.B. PALM<sup>2</sup> [Bet06], STORM<sup>3</sup> [Rus06] oder STED<sup>4</sup> [Hel03] hat SIM gegenüber diesen Verfahren einige Vorteile:

- Aufgrund wesentlich geringerer Laser-Leistung, die für SIM benötigt wird, können auch lebende Proben untersucht werden [Li15].
- SIM funktioniert mit allen verfügbaren Fluoreszenzfarbstoffen [Shal1].
- SIM ist wesentlich schneller [Li15, Li16, Kne09]

In dieser Arbeit wird Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung unter Verwendung zweidimensionaler Muster untersucht. Für den Fall rein quasikonfokaler strukturierter Beleuchtung wurde mit Schachbrettmustern und hexagonalen Mustern und inkohärenter Beleuchtung gearbeitet. Hierzu ist im Rahmen dieser Arbeit eine Veröffentlichung entstanden [Sch14]. Es wurde gezeigt, dass die Verwendung zweidimensionaler Muster bzgl. des Signal-Rausch-Verhältnisses vorteilhaft ist. Darüber hinaus ist der Informationsgehalt im ausgewerteten Bild bei Verwendung zweidimensionaler Muster weniger richtungsabhängig als bei Verwendung

---

<sup>2</sup>Photo Activated Localization Microscopy

<sup>3</sup>STochastic Optical Reconstruction Microscopy

<sup>4</sup>STimulated Emission Depletion microscopy

---

eindimensionaler Liniengitter. Es wurde außerdem gezeigt, dass es bei sowohl Schachbrett- als auch Hexagonmustern ausreicht mehrere Rohbilder aufzunehmen, bei denen das Muster in nur einer Raumrichtung verschoben werden muss, wobei zwischen der Verschieberichtung und den Frequenzvektoren des Musters ein bestimmter Winkel eingestellt wird.

Die strukturierte Beleuchtung mit hexagonalen Mustern bietet sich für die Steigerung der Auflösung an, da hexagonale Muster alle Orientierungen, die für das Linienmuster üblicherweise gewählt werden, enthalten. Um alle für die Auswertung notwendigen Rohbilder zu erzeugen, reicht es aus das Muster in einer Richtung zu verschieben. Im Fall der dreidimensionalen Auflösungssteigerung mit einem  $z$ -Stapel ist hier für eine 3D Rekonstruktion die Messung eines einzigen Bildstapels (anstelle von drei) ausreichend.

Um die Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung auch auf dicke Proben anzuwenden, wurde in dieser Arbeit SIM mit spaltkonfokaler Mikroskopie kombiniert. Hierbei wird in der Anregung das Bild des Musters nicht im gesamten Objektfeld simultan erzeugt, sondern durch einen Linienscanner sukzessive aufgebaut. Durch Synchronisation des Linienscanners mit dem Rolling-Shutter einer sCMOS<sup>5</sup> Kamera, wurde eine auswertungsfreie spaltkonfokale Detektion der SIM Rohbilder realisiert. Im Gegensatz zu bisherigen Kombinationen von SIM und linienkonfokaler Mikroskopie [Man12], erhält man hier direkt ein linienkonfokales Rohbild, ohne es erst aus weiteren Einzelbildern berechnen zu müssen. Die Ergebnisse der Auflösungssteigerung mit hexagonaler linienkonfokaler SIM (XL-SIM), die in dieser Arbeit entstanden sind, wurden in einer Veröffentlichung vorgestellt [Sch17].

Die in der Arbeit verwendeten Symbole und Abkürzungen sind in Abschnitt 1.1 aufgelistet. Das Kapitel A im Anhang enthält einen Überblick über die notwendigen mathematischen Grundlagen und Definitionen. Kapitel 2 gibt eine Zusammenfassung über die Grundlagen zur lateralen und axialen optischen Auflösung in einem Mikroskop, sowie theoretische Grundlagen zur inkohärenten und kohärenten Abbildung periodischer Strukturen. Kapitel 3 zeigt einen Überblick über die Auswertung bei quasikonfokaler strukturierter Beleuchtung sowie die Superresolution SIM. In Kapitel 4 wird strukturierte Beleuchtung mit Schachbrett- und Hexagonmustern unter Verwendung einer Verschieberichtung erläutert und die entsprechenden Verschiebewinkel hergeleitet. Außerdem wird in den Abschnitten 4.3 und 4.4 die Fehlerfortpflanzung von SIM mit Schachbrett- und Hexagonmustern im Fall von quasikonfokaler

---

<sup>5</sup>scientific Complementary Metal-Oxide-Semiconductor

und Superresolution SIM mit der von Liniengitter SIM theoretisch verglichen. Abschnitt 4.5 behandelt die bei der Superresolution SIM verwendeten Phasenmustern sowie die Kombination der hexagonalen strukturierten Beleuchtung mit spaltkonfokaler Mikroskopie. Kapitel 5 enthält die durchgeführten Messungen zur quasikonfokalen SIM mit Schachbrett- und Hexagonmustern. Die Messungen zur 3D Auflösungssteigerung mit hexagonaler linienkonfokaler SIM werden in Kapitel 6 beschrieben.



## 1.1. Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

$\forall$	Formelzeichen „für alle“
CLSM	Laserrastermikroskop (von engl. confocal laser scanning microscope)
EPI	Epifluoreszenzmikroskopie
SIM	Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung
SR-SIM	Auflösungssteigerung durch strukturierte Beleuchtung
LASER	Licht-Verstärkung durch stimulierte Emission von Strahlung von engl. <i>light amplification by stimulated emission of radiation</i>
$P_0$	Ein Punkt im Raum an dem sich die Quelle des Wellenfeldes befindet
$P$	Ein Punkt im Raum an dem das Wellenfeld berechnet werden soll
$Q$	Ein Punkt innerhalb einer beugenden Öffnung
$U(P)$	Skalare Lichtamplitude im Punkt $P$
$I(P)$	Intensität im Punkt $P$
$a$	Pupillenradius
$f$	Brennweite
$p$	(Muster-)Periode
$\ell_s = \frac{p}{\sqrt{2}}$	Kantenlänge eines Feldes beim Schachbrettmuster
$d = 2 \frac{p}{\sqrt{3}}$	Minimaler Abstand zweier Intensitätsmaxima beim hexagonalen Muster
$\vec{x} = (\vec{x}_\perp, z)$	Dreidimensionaler Vektor $\vec{x} \in \mathbb{R}^3$
$\vec{x}_\perp$	Zweidimensionaler Vektor in der $(x, y)$ -Ebene senkrecht zur optischen Achse
$z = x_\parallel$	$z$ -Koordinate, parallel zur optischen Achse
$f_r, f_x, f_y$	Raumfrequenz in $(f_r = 1/p)$ in radialer, $x$ - bzw. $y$ -Richtung
$c_m$	Fourierkoeffizient der $m$ -ten Frequenzordnung der Anregungsintensität
$\nu, \nu_x, \nu_y$	normierte Frequenz in radialer, $x$ - bzw. $y$ -Richtung
$k_x, k_y, k_z$	Raumfrequenz in $(k_x = \frac{2\pi}{p_x})$ $x$ -, $y$ - bzw. $z$ -Richtung
$h(\vec{x})$	(Intensitäts-) Punktspreizfunktion (kurz: PSF)
$h_a(\vec{x})$	Amplituden-Punktspreizfunktion (kurz: Amplituden-PSF)
$G(\nu) = G(\xi, \eta)$	Pupillenfunktion
$\lambda$	Vakuumwellenlänge
$k = \frac{2\pi n}{\lambda}$	Wellenzahl des Lichtfeldes
$k_x, k_y, k_z$	(Raum-) Frequenzen ( $ \vec{k}  = 2\pi/p$ ) in $x$ -, $y$ - und $z$ -Richtung

## 1. Einleitung

---

$\alpha_{\max} = \arcsin(a/f)$	Maximaler Eintrittswinkel
$NA = n \sin(\alpha_{\max})$	Numerische Apertur
$K$	Konditionszahl einer Matrix
$C := -\frac{iA}{2\lambda}$	Konstante - $A$ ist die Stärke der Lichtamplitude im Punkt $P_0$ (vgl. Abbildung 2.1).
$C' := 2C \frac{e^{ik(r'+s')}}{r's'}$	Konstante - $r'$ und $s'$ sind die in Abbildung 2.1 eingezeichneten Weglängen.
$c$	Vakuumlichtgeschwindigkeit
$n$	Brechungsindex
$\chi$	Polarisationswinkel
$\mathcal{K}(z)$	Konfokalitätsfunktion
$O(\vec{k})$	Optische Transferfunktion
$S(\vec{x})$	Probenfunktion bzw. genauer: Fluorophordichte in der Probe
$F$ bzw. $F_1$	Füllfaktor eines Musters für SIM
$F_2$	Zweidimensionaler Füllfaktor für SIM-Muster
$I^{(\text{exc.})}(x, y, z)$	Anregungsintensität
$I^{(\text{em.})}(x, y, z)$	Emittierte Intensität
$I^{(\text{det.})}(x, y, z)$	Detektierte Intensität
$\sigma$	Standardabweichung
SNR	Signal-zu-Rausch-Verhältnis

## 2. Optische Grundlagen

Ein wesentlicher Aspekt dieser Arbeit ist die Auflösung optischer Abbildungen. Da die geometrische Optik zur Beschreibung der optischen Auflösung nicht ausreicht, folgt in diesem Kapitel eine Zusammenfassung der wichtigsten wellenoptischen Grundlagen.

### 2.1. Optische Abbildungen

Im Fall einer fehlerfreien optischen Abbildung ist die Auflösung nur aufgrund der Beugung der Lichtwellen an der sogenannten *Apertur* begrenzt. Man nennt diesen Fall daher *beugungsbegrenzte Abbildung*. Die Apertur bezeichnet die (Blenden-)Öffnung, welche die Winkel der vom Objekt kommenden Wellen beschränkt.

Die Beugung an der Apertur kann näherungsweise mit der Beugungstheorie von Helmholtz und Kirchhoff beschrieben werden. Hierbei wird anstelle des vektoriellen Lichtfeldes nur ein skalares, monochromatisches Lichtfeld der Wellenlänge  $\lambda$  betrachtet. Die Rückwirkung der Apertur auf den Bereich vor bzw. in der Blendenöffnung wird hier vernachlässigt. [Zin98] Man betrachte Abbildung 2.1: Das Lichtfeld  $U$  an einem bestimmten Punkt  $P$  ist gegeben durch:

$$U(P) = C \iint_A \frac{e^{ik(r+s)}}{rs} [\cos(\vec{N}, r) - \cos(\vec{N}, s)] dS, \quad (2.1)$$

wobei  $r$  der Abstand der Lichtquelle vom Punkt  $Q$  in der Apertur  $A$ ,  $s$  der Abstand von  $Q$  zum Punkt  $P$ ,  $k = 2\pi/\lambda$  die Wellenzahl, und  $C := -\frac{iU}{2\lambda}$  eine Konstante, die von der Licht-Amplitude  $U$  im Punkt  $P_0$  und der Wellenlänge  $\lambda$  abhängt. Das Integral wird über die beugende Öffnung  $A$ , deren Normalenvektor mit  $\vec{N}$  bezeichnet wird, ausgeführt. Der Term  $\frac{e^{ikr}}{r}$  kann als eine vom Punkt  $P_0$  ausgehende Kugelwelle interpretiert werden. Nach dem Huygens-Fresnelschen Prinzip erzeugt diese primäre Welle, an jedem Punkt  $Q$  der Blendenöffnung eine sekundäre Kugelwelle, welche am Beobachtungspunkt  $P$  zu einer Amplitude  $\frac{e^{ik(r+s)}}{rs}$  führt. Das gesamte

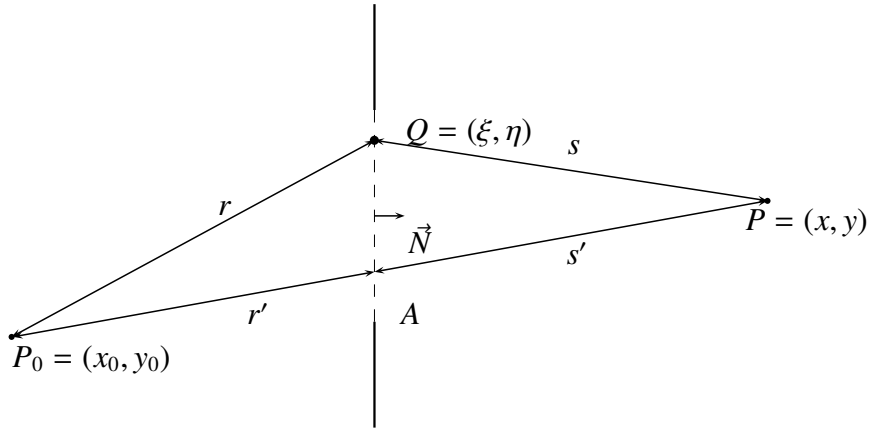


Abb. 2.1.: Skizze zur Beugungstheorie von Helmholtz und Kirchhoff.

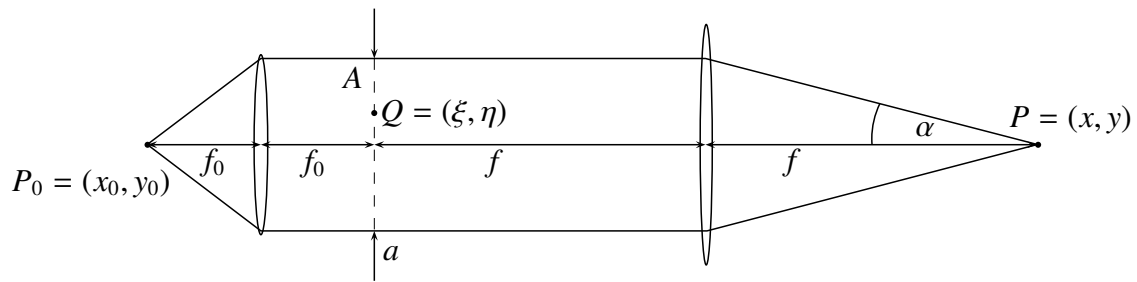
beobachtbare Feld im Punkt  $P$  entsteht durch Integration über alle Punkte  $Q$  der Blende. Sind die Abstände  $r$  und  $s$  groß im Vergleich zu den Abmessungen der Apertur  $A$ , so lässt sich Gleichung (2.1) näherungsweise schreiben als:

$$U(P) = \frac{2C \cos(\delta)}{r' s'} \iint_A e^{ik(r+s)} dS \quad (2.2)$$

Lässt man die Abstände  $r'$  und  $s'$  beliebig groß werden ( $r' \rightarrow \infty, s' \rightarrow \infty$ ) und nimmt man zusätzlich senkrechten Lichteinfall an ( $(x_0, y_0) = 0, \delta = 0$ ), so kann Gleichung (2.2) weiter gemäß der Näherung  $r + s \approx r' + s' - \frac{x\xi}{s'} - \frac{y\eta}{s'} + O\left(\frac{\xi^2}{s'}, \frac{\eta^2}{s'}\right)$  vereinfacht werden zu:

$$U(x, y) = \underbrace{2C \frac{e^{ik(r'+s')}}{r' s'}}_{=: C'} \iint_A e^{-ik\left(\frac{x\xi}{s'} + \frac{y\eta}{s'}\right)} d\xi d\eta \quad (2.3)$$

$(\xi, \eta)$  sind wie in der Skizze in Abbildung 2.1 angedeutet die Koordinaten in der Apertur,  $(x, y)$  die Koordinaten des Punktes  $P$ , und  $O\left(\frac{\xi^2}{s'}, \frac{\eta^2}{s'}\right)$  bezeichnet die Terme der Entwicklung von  $(r + s)$ , die quadratisch in  $\xi$  und  $\eta$  sind. Diese Näherung des kirchhoffschen Beugungsintegrals wird als *Fraunhofersche Näherung* bezeichnet und ist dann gültig, wenn die Lichtquelle und der Beobachtungspunkt  $P$  sehr weit von der beugenden Öffnung entfernt sind. In diesem Fall spricht man von der *Fraunhoferschen Beugung*. Die paraxiale Näherung ist auch dann gültig, wenn die Lichtquelle (bzw. der Lichtpunkt  $P_0$ ) wie in Abbildung 2.2 aus dem Unendlichen in die Apertur abgebildet wird und die Apertur selbst wieder ins Unendliche abgebildet wird. Eine solche Abbildung wird in der Mikroskopie auch als *Unendlich-Strahlengang* bezeichnet. Da die in dieser Arbeit verwendeten Mikroskope auf solchen Strahlengängen beruhen, wird im weiteren diese Näherung zur Beschreibung der beugungsbegrenzten Abbildung eines



**Abb. 2.2.:** Beispiel zur Fraunhoferschen Beugung.

einzelnen Lichtpunktes verwendet. Das Integral in Gleichung (2.3) wird über die Fläche der Apertur ausgeführt. Führt man die sogenannte *Pupillenfunktion*  $G(\xi, \eta)$  ein, so kann (2.3) als Fourier-Integral geschrieben werden:

$$U(x, y) = \iint_A G(\xi, \eta) e^{-ik\left(\frac{x\xi}{f} + \frac{y\eta}{f}\right)} d\xi d\eta \quad , \quad (2.4)$$

wobei  $G(\xi, \eta)$  gegeben ist durch

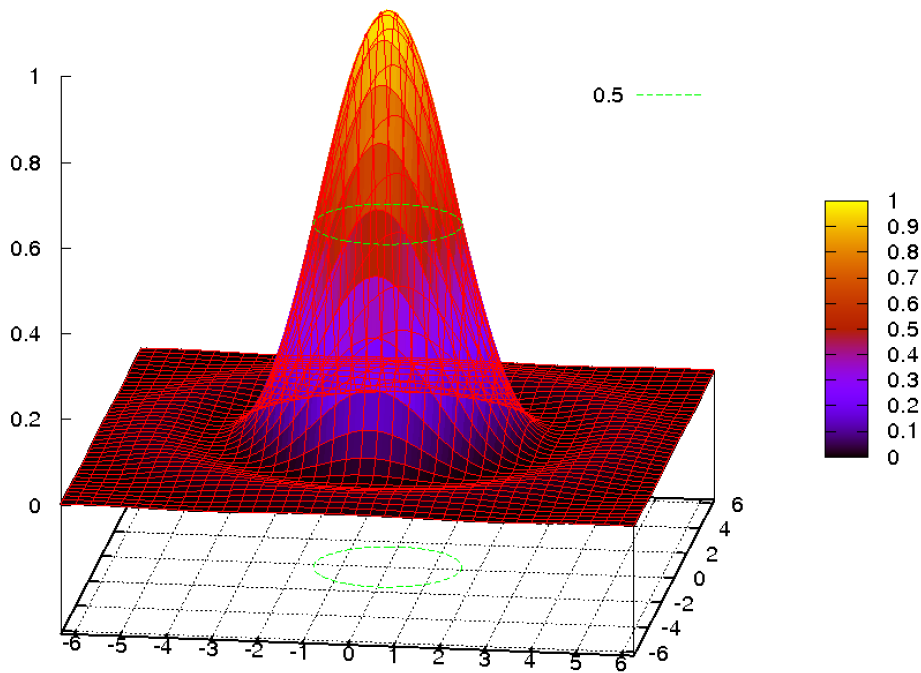
$$G(\xi, \eta) = \begin{cases} C', & \text{innerhalb der Blendenöffnung} \\ 0, & \text{außerhalb} \end{cases} \quad . \quad (2.5)$$

Im Bezug auf Abbildung 2.2 entspricht der Abstand  $s'$  der Brennweite  $f$ . Die Ausdrücke  $\frac{x}{f}$  bzw.  $\frac{y}{f}$  in Gleichung (2.4) können als Richtungskosinus, und dementsprechend  $k \cdot \frac{x}{f}$  bzw.  $k \cdot \frac{y}{f}$  als laterale Komponenten  $(x, y)$  des Wellenvektors  $\vec{k}$  aufgefasst werden. Gleichung (2.4) ist die Grundlage für die sogenannte *Fourieroptik*.

Die Amplitudenverteilung, die sich bei Abbildung eines einzelnen Lichtpunktes  $P_0$  aufgrund der Beugung an der Apertur  $A$  eines optischen Systems ergibt, ist also in der Näherung der Fraunhoferschen Beugung durch die Fourier-Transformierte der Blenden- bzw. Pupillenfunktion  $G(\xi, \eta)$  gegeben. Im Fall einer kreisförmigen Apertur mit Radius  $a$ , wird aus Gleichung (2.4) [Bor99, S. 439ff]:

$$U(P) = C' \int_0^a \int_0^{2\pi} e^{-ik\frac{\rho r}{s'} \cos(\theta - \psi)} \rho d\rho d\theta \quad , \quad (2.6)$$

wobei  $(\rho, \theta)$  die Polarkoordinaten in der Apertur und  $(r, \psi)$  die Polarkoordinaten in der Ebene des Beugungsmusters bzw. der Bildebene bezeichnen. Das Integral über  $\theta$  in (2.6) stimmt



**Abb. 2.3.:** Grafische Darstellung der Funktion  $|2 \frac{J_1(x)}{x}|^2$ . Der erste Beugungsring des Beugungsmusters ist noch zu erkennen. Die volle Halbwertsbreite der Funktion beträgt in etwa  $\pi$ , der radiale Abstand des ersten Minimums vom zentralen Maximum etwa  $1,22\pi$ .

mit der Integraldarstellung der Bessel-Funktion erster Art nullter Ordnung (siehe Gleichung (A.11)) überein. Das Integral über  $\rho$  ergibt sich dann aus den Rekursionsrelationen der Bessel-Funktionen (siehe Gleichung (A.12))

$$U(P) = 2\pi C' \int_0^a J_0\left(k \frac{\rho r}{s'}\right) \rho d\rho = \pi C' a^2 \left[ 2 \frac{J_1(kar/f)}{kar/f} \right] =: h_a(r, \psi) \quad . \quad (2.7)$$

$h_a(r, \psi)$  ist die Amplitudenverteilung, die man bei Abbildung eines einzigen Lichtpunktes mit einer beugungsbegrenzten Optik erhält und sie wird daher als *Amplituden-Punktspreizfunktion* (oder kurz Amplituden-PSF) bezeichnet. Sie entspricht aufgrund (2.4) der Fourier-transformierten einer kreisförmigen Blenden- bzw. Pupillenfunktion  $G(\xi, \eta)$ . Dementsprechend erhält man für die Intensitätsverteilung

$$I(P) = |U(P)|^2 = I_0 \left[ 2 \frac{J_1(kar/s')}{kar/s'} \right]^2 =: h(r, \psi) = h(r) \quad , \quad (2.8)$$

mit  $I_0 = C'^2(\pi a^2)^2$ . Das Intensitätsprofil in Gleichung (2.8) wird als (*Intensitäts-*) *Punktspreizfunktion* bzw. auch kurz als *PSF* bezeichnet. Diese Funktion wurde zuerst von *G.B. Airy* berechnet und wird daher auch „Airy-Scheibchen“ oder auch „Airy-Beugungsmuster“

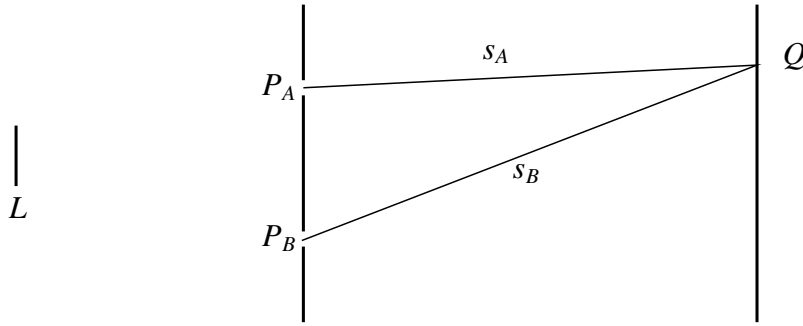
genannt. Die Funktion  $J_1(x)$  ist die Bessel-Funktion erster Art erster Ordnung. Das Airy-Beugungsmuster ist in Abbildung 2.3 gezeigt.

## 2.2. Auflösungsvermögen eines Mikroskops

Da die Proben, die mit einem Mikroskop untersucht werden in der Regel nicht von sich aus Licht emittieren, müssen mikroskopische Proben durch einen so genannten *Kondensor* beleuchtet werden. In der Fluoreszenzmikroskopie wird die mikroskopische Probe seit der Erfindung dichroitischer Spiegel in der Regel im Auflicht durch den so genannten *Anregungsstrahlengang* beleuchtet. Der Strahlengang der Anregung verläuft hierbei über einen solchen dichroitischen Spiegel, welcher zunächst das Anregungslicht reflektiert. Sowohl der Anregungsstrahlengang als auch der Emissionsstrahlengang verlaufen durch dasselbe Mikroskop-Objektiv. Diese Form der Fluoreszenzmikroskopie wird auch als *Epifluoreszenzmikroskopie* bezeichnet. Die zur Fluoreszenz angeregten Farbstoffmoleküle in der Probe emittieren inkohärentes Licht, dessen Wellenlänge aufgrund der *Stokes-Verschiebung* größer ist, als die des Anregungslichtes und daher durch den dichroitischen Spiegel transmittiert. Die (räumlich und zeitlich) inkohärente Emission wird durch den so genannten *Emissions-Strahlengang* z.B. auf eine Kamera abgebildet. Im Gegensatz zum Emissions-Strahlengang, der grundsätzlich als inkohärent betrachtet werden kann, muss man in der Fluoreszenzmikroskopie in der Anregung zwischen inkohärenter und kohärenter Anregung unterscheiden, wobei in dieser Arbeit aufgrund der Betrachtung monochromatischer Abbildungen ausschließlich die räumliche Kohärenz eine Rolle spielt. Gerade bei Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung ist dieser Unterschied von Bedeutung.

### 2.2.1. Kohärenz

Die theoretische Grundlage zur Beschreibung von Kohärenz von Lichtwellen ist die *Wechselseitige Kohärenzfunktion*. Sie ist gegeben durch die komplexe Kreuzkorrelation zweier Licht-Amplituden  $U(P_a, \tau) := U_A(\tau)$  und  $U_B(\tau)$  die von den Punkten  $P_A$  und  $P_B$  (siehe Abbildung



**Abb. 2.4.:** Der Young'sche Doppelspaltversuch: Die Lichtwellen, die von den Blenden  $A$  und  $B$  ausgehen, welche von der ausgedehnten Lichtquelle  $L$  beleuchtet werden interferieren im Punkt  $Q$ .

2.4) ausgehen:

$$\Gamma_{A,B}(\tau) = \langle U_A(t + \tau) U_B^*(t) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_{-\frac{T}{2}}^{\frac{T}{2}} U(P_A, t + \tau) U^*(P_B, t) dt \quad (2.9)$$

Die Funktion

$$\gamma_{A,B}(\tau) = \frac{\Gamma_{A,B}(\tau)}{\sqrt{\Gamma_{A,A}(0) \Gamma_{B,B}(0)}} = \frac{\Gamma_{A,B}(\tau)}{\sqrt{I_A} \sqrt{I_B}} = |\gamma_{A,B}(\tau)| e^{i\alpha_{A,B}(\tau)} \quad (2.10)$$

ist ein Maß für Kohärenz und wird als *komplexer Kohärenzgrad* oder auch als *normierte wechselseitige Kohärenzfunktion* bezeichnet [Bor99, S. 501]. Im Falle rein räumlicher Kohärenz, setzt man  $\tau = 0$  und erhält so den *gleichzeitigen komplexen Kohärenzgrad*

$$j_{A,B} = \gamma_{A,B}(0)$$

Man unterscheidet die drei Fälle:

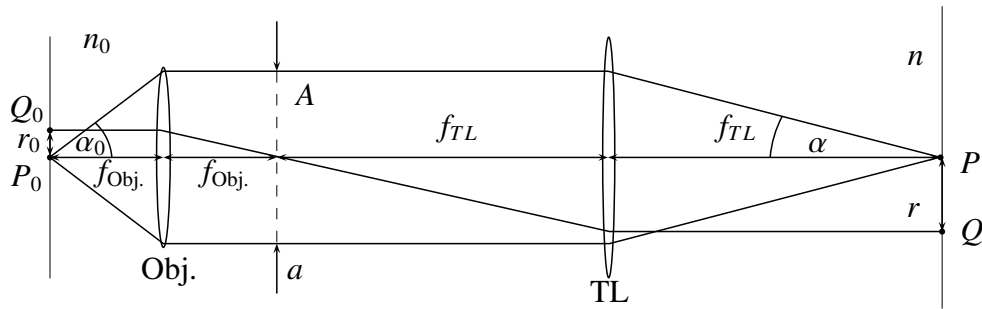
$$\begin{cases} j_{A,B} = 0 & \text{total inkohärent} \\ j_{A,B} = 1 & \text{total kohärent} \\ 0 < j_{A,B} < 1 & \text{partiell kohärent} \end{cases}$$

Im Fall von monochromatischen Wellen, ist die Intensität im Punkt  $Q$  in Abbildung 2.4 gegeben durch [Goo84, S. 174ff]

$$I(Q) = I_A(Q) + I_B(Q) + 2 \sqrt{I_A(Q)} \sqrt{I_B(Q)} |j_{A,B}| \cos(\alpha_{A,B} \left( \frac{s_A - s_B}{c} \right) - \delta) \quad , \quad (2.11)$$

wobei  $\delta$  die Phasendifferenz der beiden Wellen ist. Nimmt man an dass  $I_A(Q) = I_B(Q)$ , so entspricht  $|j_{A,B}|$  gerade dem Kontrast der Intensität in (2.11). Die Funktion  $j_{A,B}$  ist daher anschaulich ein Maß für Sichtbarkeit des Interferenzmusters bei der Überlagerung zweier Lichtamplituden. Im total inkohärenten Fall ist kein Interferenzmuster sichtbar, im Fall totaler räumlicher Kohärenz ergibt sich der maximal mögliche Kontrast von 1 bzw. 100%.





**Abb. 2.5.:** Skizze zur inkohärenten Abbildung in einem Mikroskop.

### 2.2.2. Inkohärente Abbildung

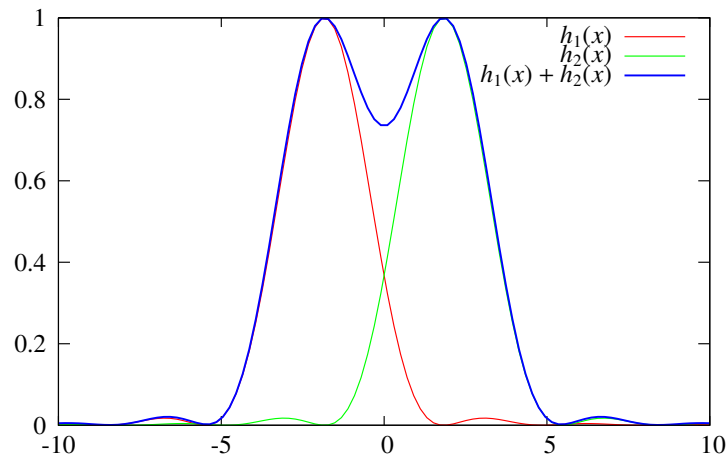
Die inkohärente Abbildung in einem Mikroskop mit Unendlich-Strahlengang kann man sich schematisch wie in Abbildung 2.5 vorstellen. Der Abbildungsmaßstab des Mikroskops ist durch das Verhältnis der Brennweiten von Tubuslinse ( $f_{TL}$ ) und Objektiv ( $f_{Obj.}$ ) gegeben. Da der Winkel  $\alpha$  als klein angenommen werden kann ( $\alpha \ll 1$ ), gilt näherungsweise  $\alpha \approx \frac{a}{f_{TL}}$ . Es seien  $n_0$  und  $n$  die Brechungsindizes im Objekt- und im Bildraum. Der Winkel  $\alpha_0$  ist der größte Winkel im Objektraum, der gerade noch die Apertur des optischen Systems passieren kann.

Die beiden Punkte  $P_0$  und  $Q_0$  werden durch das Objektiv und die Tubuslinse auf die Detektionsebene/Kameraebene abgebildet. Da zunächst von inkohärenten Punktlichtquellen ausgegangen wird, ist das Bild der beiden Punkte, (d.h. die Intensität in der Bildebene) durch die Summe der Bilder der Punkte, also durch die Summe der Punktspreizfunktionen bei  $P$  ( $h_1(x)$ ) und bei  $Q$  ( $h_2(x)$ ) gegeben ( $j_{A,B} = 0$  vgl. Abschnitt 2.2.1).

Nach dem Kriterium von *Rayleigh*<sup>1</sup>, gelten die beiden Punkte noch als aufgelöst, falls das erste Minimum der PSF bei  $P$  auf das Maximum der PSF bei  $Q$  zu liegen kommt und umgekehrt, wie in Abbildung 2.6 gezeigt. In diesem Fall beträgt die Intensität in der Mitte zwischen den beiden Intensitätsmaxima etwa 73,5% der maximalen Intensität.

Die Funktion  $|J_1(x)/x|^2$  (siehe Gleichung (2.8) und Abbildung 2.3) nimmt das erste Minimum an, wenn sein Argument etwa den Wert  $1.22\pi$  annimmt. Daraus folgt für den minimalen Abstand, den zwei inkohärente Punktlichtquellen im Bildraum haben dürfen um nach Rayleigh

<sup>1</sup> John William Strutt, 3. Baron Rayleigh (\*12.11.1842, †30. 06. 1919)



**Abb. 2.6.:** Gesamtintensität ( $h_1(x) + h_2(x)$ ) bei inkohärenter Überlagerung zweier Airy-Beugungsmuster in dem von Rayleigh als Auflösungsgrenze festgelegtem (Mindest-)Abstand. Das erste Minimum der PSF  $h_1$  liegt beim Maximum von  $h_2$  und umgekehrt. Die Gesamtintensität in der Mitte zwischen den beiden Maxima entspricht in etwa 73,5% der maximalen Intensität.

als aufgelöst zu gelten

$$r \geq 0.61 \frac{\lambda f_{\text{TL}}}{na} = 0,61 \frac{\lambda}{n \sin(\alpha)}$$

Es gilt

$$-nr \sin(\alpha) = n_0 r_0 \sin(\alpha_0)$$

so dass für  $r_0$  folgt:

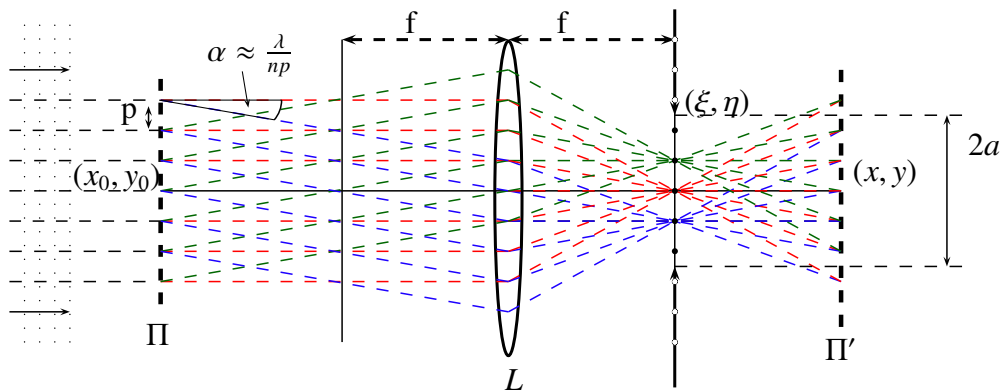
$$\boxed{|r_0| \geq 0.61 \frac{\lambda}{n_0 \sin(\alpha_0)} = 0.61 \frac{\lambda}{\text{NA}} =: r_{\text{Rayleigh}}} \quad (2.12)$$

NA ist eine Abkürzung für die *numerische Apertur* des Mikroskop-Objektivs und ist definiert als  $\text{NA} = n_0 \sin(\alpha_0)$ . Gleichung (2.12) definiert das Auflösungsvermögen eines Mikroskops für den Fall einer total inkohärenten Abbildung.

### 2.2.3. Kohärente Abbildung

Wie bereits beschrieben spielt die kohärente Abbildung in dieser Arbeit ausschließlich im Anregungsstrahlengang eine Rolle. Darüber hinaus ist jetzt und im Weiteren aufgrund der Betrachtung rein monochromatischer Abbildungen nur die räumliche Kohärenz von Bedeutung.

Bei einer optischen Abbildung mit kohärentem Licht müssen anstelle der Intensitäten die Am-



**Abb. 2.7.:** Skizze der Bildentstehung nach Abbe. Der Übersichtlichkeit wegen sind nur die 0. Beugungsordnung rot und die ersten Beugungsordnungen grün und blau eingezeichnet.

plituden des Lichtfeldes betrachtet werden. Nach der Theorie von *Abbe*<sup>2</sup> wird das beleuchtende Licht zunächst am Objekt gebeugt (siehe Abbildung 2.7), d.h. die einzelnen Raumfrequenzen des Objekts wirken wie Beugungsgitter. Nimmt man ein Objekt an, welches nur eine einzige Frequenz enthält (also ein Beugungsgitter), und von einer ebenen Welle beleuchtet wird, so erhält man in der hinteren Brennebene der Linse *L* das Fraunhofersche Beugungsbild, also die Fourier-Transformierte der Licht-Amplitude in der Objektebene  $\Pi$ . Nach dem Prinzip von *Huygens*<sup>3</sup>, kann jeder Punkt  $(\xi, \eta)$  in der hinteren Brennebene seinerseits wieder als Lichtquelle interpretiert werden von dem eine sekundäre Welle ausgeht. Das Huygenssche Prinzip wurde von *Fresnel*<sup>4</sup> erweitert, indem die Weglängenunterschiede der sekundären Wellen mitberücksichtigt werden. Dadurch wurde auch die mathematische Beschreibung von Beugungseffekten möglich. Diese Erweiterung des Huygensschen Prinzips ist als *Huygens-Fresnel'sches* Prinzip bekannt.

Die Interferenz der sekundären Wellen, die von jedem Punkt der hinteren Brennebene ausgehen, ergibt das Bild des Objektes in der Bildebene  $\Pi'$ . Ein perfektes Bild des Objektes, d.h. ein Bild, welches dieselben Informationen enthält wie das Objekt selbst, müsste durch die Interferenz aller vom Objekt erzeugten Beugungsordnungen entstehen, was aufgrund der endlichen Ausdehnung der Pupille in der hinteren Brennebene der Linse (engl. *Back-Focal-Plane*, kurz *BFP*) und der Existenz unendlich vieler Beugungsordnungen nicht möglich ist. Der Index der höchsten Beugungsordnung  $\bar{m}$ , die noch die Apertur passieren kann ist gegeben

<sup>2</sup>Ernst Karl Abbe (\*23. 01. 1840, †14. 01. 1905)

<sup>3</sup>Christiaan Huygens (\*14.04.1629, †08.07.1695)

<sup>4</sup>Augustin Jean Fresnel (\*10.05.1788, †14.07.1827)

durch

$$\bar{m} = \frac{apn}{\lambda f} = \frac{NA}{\lambda} p \quad ,$$

wobei  $a$  der Radius der Pupille,  $\lambda/n$  die effektive Wellenlänge in der Ebene des Objekts und  $p$  die Gitterperiode ist. Wenn man verlangt, dass vom Objekt mit der Periode  $p$  zumindest noch eine einzige Beugungsordnung (zusätzlich zur nullten Ordnung) die Apertur passieren soll ( $\bar{m} \geq 1$ ), so erhält man

$$p_{\min} \geq \frac{\lambda}{NA} \quad (2.13)$$

Falls das Objekt mit Licht beleuchtet wird, das wie in Abbildung 2.7 nur einen einzigen Richtungsanteil enthält, gibt Gleichung (2.13) die Auflösung des optischen Systems an.

Gleichung (2.13) gilt für den Fall, dass die Probe nur mit einer ebenen Welle beleuchtet wird. Nimmt man an, dass die Pupille des Kondensors voll ausgeleuchtet wird und dass seine NA die selbe ist, wie die des Mikroskopobjektivs, so gilt die bekannte Formel von Abbe

$$\boxed{d_{\min} = \frac{\lambda}{2NA}} \quad . \quad (2.14)$$

Der Abstand  $d_{\min}$  in Gleichung (2.14) stimmt mit der vollen Halbwertsbreite der Punktspreizfunktion (2.8) überein.

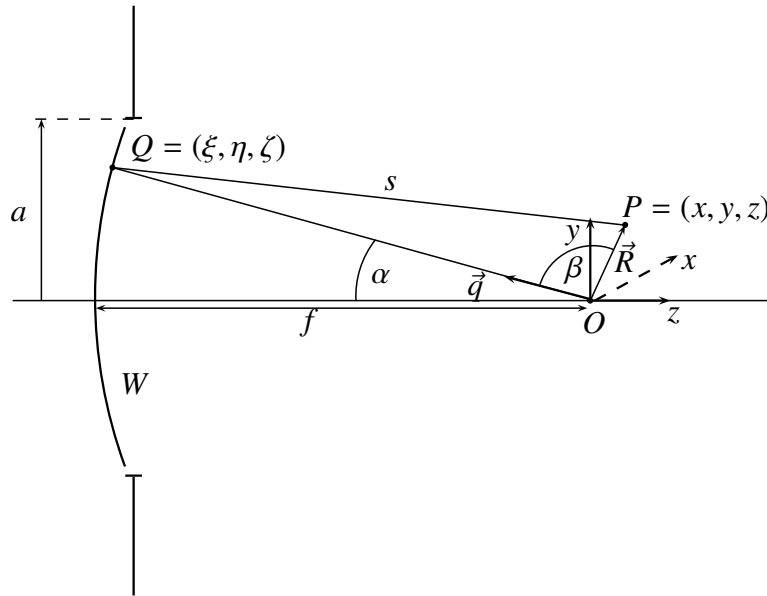
Die Anregung im Fluoreszenzmikroskop ist in der Realität nie total kohärent bzw. inkohärent. Stattdessen findet man in der Realität einen Übergang zwischen diesen beiden Grenzfällen vor, welcher dann als *partielle Kohärenz* bezeichnet wird. Siehe hierzu z.B. Abschnitt 2.2.1.

### 2.3. Defokus

Da in der (konfokalen) Mikroskopie nicht nur laterale Auflösung (d.h. in  $(x, y)$ -Richtung) sondern auch axiale Auflösung (in  $z$ -Richtung) wichtig ist, werden in folgendem Abschnitt die theoretischen Grundlagen zur Beschreibung einer defokussierten optischen Abbildung erläutert. Abgesehen von Defokussierung, wird in diesem Abschnitt zunächst eine fehlerfreie optische Abbildung angenommen.

Man betrachte Abbildung 2.8: Eine Kugelwelle mit Zentrum im Punkt  $O$  erzeugt in allen Punkten, der durch eine Apertur beschränkte Kugelsphäre  $W$  eine Amplitude  $\exp(ikf)/f$ . Nach dem Huygens-Fresnel-Prinzip kann jeder Punkt  $Q$  von  $W$  dementsprechend als Zentrum

einer sekundären Kugelwelle interpretiert werden, welche für einen beliebigen Punkt  $Q$  von  $W$  im Punkt  $P$  die Amplitude  $\exp(ikf)/f \cdot \exp(iks)/s$  erzeugt. Die gesamte Amplitude im Punkt  $P$  ergibt sich dann aus dem Integral über alle von der Fläche  $W$  ausgehenden Kugelwellen:



**Abb. 2.8.:** Beugung einer in den Punkt  $O$  einlaufenden Kugelwelle an einer kreisförmigen Blende  $W$ .

$$U(P) = 2C \frac{e^{-ikf}}{f} \iint_W \frac{e^{iks}}{s} dS \quad . \quad (2.15)$$

Falls  $a \ll f$  gilt, so kann (2.15) genähert werden zu:

$$U(P) \approx \frac{2C}{f^2} \iint_W e^{ik(s-f)} dS \quad (2.16)$$

Für die optische Weglänge  $s$  vom Punkt  $Q$  zum Punkt  $P$  gilt

$$s = \sqrt{f^2 + |\vec{R}|^2 - 2f|\vec{R}| \cos(\beta)}$$

Falls  $(x = y = 0)$  ergibt sich

$$\begin{aligned} s &= \sqrt{f^2 + z^2 + 2fz \cos(\alpha)} = f \sqrt{1 + \left(\frac{z}{f}\right)^2 + 2\left(\frac{z}{f}\right) \cos(\alpha)} = \\ &= f + z \cos(\alpha) + \sin^2(\alpha) \frac{z^2}{2f} + O\left(\frac{z^3}{f^2}\right) \quad , \end{aligned} \quad (2.17)$$

wodurch sich für kleine Defokussierungen ( $z \ll f$ ) und kleine Winkel ( $\alpha \ll 1$ ) der Ausdruck  $(s - f)$  nähern lässt zu

$$(s - f) \approx z \cos(\alpha) \approx z - \frac{1}{2} z \underbrace{\sin^2(\alpha)}_{\approx (\frac{\rho}{f})^2} . \quad (2.18)$$

Im Allgemeinen (d.h.  $x \neq 0, y \neq 0$ ) wird der Weglängenunterschied  $(s - f)$  bei kleinen Winkeln  $\alpha$  durch  $(s - f) \approx -(\vec{q} \cdot \vec{R})$  genähert, wobei  $\vec{q}$  der Einheitsvektor in Richtung der Verbindungslinie von  $O$  nach  $Q$  ist:  $\vec{q} = (\xi, \eta, \zeta)^t / f$  (siehe Abbildung 2.8). Aus Gleichung (2.16) wird so

$$U(P) \approx \frac{2C}{f^2} \iint_W e^{-ik\vec{q}\vec{R}} \underbrace{dS}_{f^2 d\Omega} = 2C \iint_{\Omega} e^{-ik\vec{q}\vec{R}} d\Omega . \quad (2.19)$$

Gleichung (2.19) ist bekannt als *Debye-Integral*.

Für die Koordinate  $\zeta$  in Abbildung 2.8 gilt:

$$\zeta = \sqrt{f^2 - \rho^2} = -f \left[ 1 - \frac{1}{2} \frac{\rho^2}{f^2} + O\left(\left(\frac{\rho}{f}\right)^3\right) \right] .$$

Für kleine Winkel  $\alpha \ll 1$  ergibt sich hieraus als Näherung für den Weglängenunterschied

$$(\vec{q} \cdot \vec{R}) = \frac{x\xi + y\eta + z\zeta}{f} \approx \frac{\rho r \cos(\theta - \psi)}{f} + z \left[ 1 - \frac{1}{2} \frac{\rho^2}{f^2} + \dots \right] , \quad (2.20)$$

wobei im Folgenden zunächst kleine Winkel  $\frac{\rho}{f} \ll 1$  angenommen und Terme der Ordnung  $\left(\frac{\rho}{f}\right)^3$  vernachlässigt werden. Für  $(r = 0)$  stimmt die Näherung in (2.20) mit der in Gleichung (2.18) überein und wird in der Fachliteratur auch als *Paraxiale Näherung* bezeichnet. Die Größen  $(\rho, \theta)$  und  $(r, \psi)$  bezeichnen wie in Gleichung (2.6) die Polarkoordinaten in der Apertur und in der Ebene des Beugungsbildes. Insgesamt ergibt sich ähnlich wie in Gleichung (2.6)

$$U(P) = \underbrace{\frac{2C}{f^2}}_{\approx C'} e^{ikz} \int_0^a \int_0^{2\pi} \rho d\rho d\theta e^{-ik\left(\frac{\rho r}{f} \cos(\theta - \psi)\right) - i\frac{1}{2}k\left(\frac{\rho}{f}\right)^2 z} . \quad (2.21)$$

Das Integral über  $\theta$  in Gleichung (2.21) ergibt analog zu Gleichung (2.7):

$$U(P) = 2\pi C' \int_0^a J_0\left(k \frac{\rho r}{f}\right) e^{-i\frac{1}{2}k\frac{\rho^2}{f^2}z} \rho d\rho \quad (2.22)$$

Gleichung (2.22) lässt sich noch weiter analytisch auswerten, indem die Exponentialfunktion im Argument des Integrals in Real- und Imaginärteil zerlegt wird. Die sich so ergebenden

Integrale können dann als Reihe von Lommel-Funktionen berechnet werden. Für weitere Details zur Berechnung der dreidimensionalen PSF siehe z.B. [Bor99, S. 484ff].

Die dreidimensionale Intensitätsverteilung  $I(P) = I(x, y, z)$  der Punktspreizfunktion ist für kleine Aperturen näherungsweise durch das Betragsquadrat des Ausdrucks in Gleichung (2.22) gegeben.

Das Integral über die dreidimensionale PSF in  $(x, y)$  Richtung ist eine Funktion von  $z$  und ist aufgrund der Energieerhaltung eine Konstante:

$$\iint_{-\infty}^{\infty} dx dy I(x, y, z) =: \mathcal{K}(z) \equiv \text{konst.} \quad (2.23)$$

Für den Schnitt der Funktion  $I(x, y, z)$  für  $(x = y = 0)$  in  $z$ -Richtung ergibt sich aus (2.22) für  $r = 0$ :

$$I(0, 0, z) = I_0 \text{sinc} \left[ \left[ \frac{k}{4} \left( \frac{a}{f} \right)^2 z \right] \right]^2 = I_0 \left[ \text{sinc} \left( n \frac{\pi}{2\lambda} \left( \frac{NA}{n} \right)^2 z \right) \right]^2, \quad (2.24)$$

wobei  $I_0$  die maximale Intensität der PSF im Punkt  $(x, y, z) = (0, 0, 0)$  ist (vgl. Gleichung (2.8)). Analog zum Rayleigh-Kriterium (siehe Gleichung (2.12)) kann man zwei Punktlichtquellen in  $z$ -Richtung gerade noch als aufgelöst betrachten, falls das Maximum der einen PSF auf dem Minimum der anderen zum liegen kommt und umgekehrt. Auf diese Weise erhält man aus Gleichung (2.24) für den minimalen Abstand den zwei Punktlichtquellen in  $z$ -Richtung gerade noch haben dürfen um aufgelöst werden zu können

$$\boxed{z_{\min} = \frac{2n\lambda}{NA^2}}. \quad (2.25)$$

Analog zu Gleichung (2.14) kann man die Auflösung in  $z$ -Richtung auch durch die volle Halbwertsbreite der 3D-PSF definieren. In dem Fall erhält man aus Gleichung (2.24)

$$z_{\min} \approx \frac{1,77n\lambda}{NA^2}. \quad (2.26)$$

Die Gleichungen (2.25) und (2.26) sind als Abschätzung für die  $z$ -Auflösung für kleine Aperturen gültig.

### 2.3.1. Beschreibung des Defokus mit der Fehlerfunktion

Optische Abbildungen sind im Allgemeinen nicht nur beugungsbegrenzt sondern auch mit anderen optischen Fehlern behaftet, welche sich beschreiben lassen, indem Gleichung (2.15)

um eine sogenannte *Fehlerfunktion*  $\Phi(\xi, \eta)$  erweitert wird:

$$U(P) = 2C \frac{e^{-ikf}}{f} \iint_W \frac{e^{i(k.s + \Phi(\xi, \eta))}}{s} dS \quad (2.27)$$

Analog zu Gleichung (2.3) kann Gleichung (2.27) für den Fall  $a \ll f, a \ll s$  genähert werden zu

$$U(P) = C' \iint_W e^{-ik\left(\frac{x\xi}{f} + \frac{y\eta}{f}\right)} e^{i\Phi(\xi, \eta)} dS \quad (2.28)$$

Für den Fall einer kreisförmigen Apertur ergibt sich

$$U(P) = C' \int_0^a \int_0^{2\pi} \rho d\rho d\theta e^{-ik\left(\frac{\rho}{f} \cos(\theta - \psi)\right)} e^{i\Phi(\xi, \eta)} \quad (2.29)$$

Genau wie in Gleichung (2.4), können Gleichung (2.28) bzw. (2.29) als Fourier-Integral geschrieben werden, indem man eine Pupillenfunktion  $G(\xi, \eta)$  einführt:

$$G(\xi, \eta) = \begin{cases} C' e^{i\Phi(\xi, \eta)}, & \text{innerhalb der Öffnung} \\ 0, & \text{außerhalb} \end{cases} \quad (2.30)$$

Ein Vergleich von (2.29) mit (2.21) zeigt, dass die Fehlerfunktion im Falle einer um den Betrag  $z$  defokussierten Abbildung gegeben ist durch

$$\Phi_d(\xi, \eta) = \Phi_d(\rho, \theta) = -\frac{1}{2}k \left(\frac{\rho}{f}\right)^2 z \quad (2.31)$$

Dementsprechend ist die Pupillenfunktion (2.30) bei einer defokussierten Abbildung gegeben durch

$$G(\rho, \theta, z) = \begin{cases} C' e^{-\frac{1}{2}i\frac{2\pi}{\lambda}\left(\frac{\rho}{f}\right)^2 z}, & \text{innerhalb der Öffnung} \\ 0, & \text{außerhalb} \end{cases} \quad (2.32)$$

Eine beliebige Fehlerfunktion  $\Phi(\xi, \eta)$  kann als Reihe von *Zernike*-Polynomen dargestellt werden, wobei die Zernike Polynome direkt bekannten optischen Fehlern wie z.B. Astigmatismus, Coma, Sphärische Abberation etc. zugeordnet werden können. Für weitere Details zur theoretischen Behandlung optischer Fehler und zur Darstellung optischer Fehler mit Zernike Polynomen siehe z.B. [Bor99, S. 518ff].



## 2.4. Optische Transferfunktion

Wie in Abschnitt 2.1 beschrieben, ist die Licht-Amplitude eines Airy-Scheibchens gerade durch die Fourier-Transformierte der kreisförmigen Pupillenöffnung  $G(\xi, \eta)$  gegeben und wird als Amplituden-PSF  $h_a$  bezeichnet. Das Betragsquadrat dieser Amplitude ergibt dann die Intensitätsverteilung, die man bei beugungsbegrenzter (fehlerfreier) Abbildung eines einzigen Lichtpunktes erhält.

### 2.4.1. Kohärente optische Transferfunktion

Wird anstelle eines einzigen Lichtpunktes ein ausgedehntes Objekt abgebildet so kann bei kohärenter Abbildung mit einem *linear-translationsinvarianten* optischen System, die Amplitude in der Bildebene  $U_1(x_1, y_1)$  durch die Faltung der Amplitude in der Objektebene  $U_0(x_0, y_0)$  mit der Amplituden-PSF  $h_a(x_1 - x_0, y_1 - y_0)$  (siehe Gleichung (2.7)) berechnet werden.

$$U_1(x, y) = \iint_{-\infty}^{\infty} dx_0 dy_0 U_0(x_0, y_0) h_a(x - x_0, y - y_0) \quad (2.33)$$

Translationsinvariant bedeutet hier, dass die Eigenschaften des optischen Systems nicht davon abhängen, welcher Punkt  $(x_0, y_0)$  in der Objektebene abgebildet wird. Die Amplitude im Objektraum kann man sich als Summe einzelner Punkte vorstellen. Linear heißt, dass man annimmt, dass die Amplitude im Bild des Objekts als Summe der Bilder der einzelnen Objektpunkte gegeben ist.

Wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben betrachtet man bei kohärenter Abbildung auch die Beugung am Objekt selbst. Jede einzelne im Objekt enthaltene Raumfrequenz der Periode  $p$  wirkt wie ein Beugungsgitter und beugt die einfallende ebene Welle um einen Winkel  $\sin(\theta_x) = \frac{\lambda}{np} = \frac{\xi}{R}$  in  $x$ -Richtung bzw.  $\sin(\theta_y) = \frac{\eta}{R}$  in  $y$ -Richtung.

Es seien daher  $f_x := \frac{\xi n}{\lambda R}$  und  $f_y := \frac{\eta n}{\lambda R}$  Raumfrequenzen (d.h. reziproke Perioden) in  $x$  und  $y$ -Richtung. Dann gilt nach Gleichung (2.4):

$$\begin{aligned} \tilde{U}_0(\xi, \eta) &= \tilde{U}_0(f_x, f_y) = \iint_{-\infty}^{\infty} dx_0 dy_0 U_0(x_0, y_0) e^{2\pi i [f_x x_0 + f_y y_0]} \\ \tilde{U}_1(\xi, \eta) &= \tilde{U}_1(f_x, f_y) = \iint_{-\infty}^{\infty} dx dy U_1(x, y) e^{2\pi i [f_x x + f_y y]} \end{aligned}$$

Aus dem Faltungstheorem (siehe Gleichung (A.10)) und Gleichung (2.33) folgt für die Fourier-Transformierten  $\tilde{U}_0(f_x, f_y)$  und  $\tilde{U}_1(f_x, f_y)$ :

$$\tilde{U}_1(f_x, f_y) = \tilde{U}_0(f_x, f_y) \cdot G(f_x, f_y) \quad (2.34)$$

Die Beugung der Lichtwellen an der Pupille wirkt sich bei der Abbildung eines ausgedehnten Objektes wie ein linearer Tiefpassfilter auf die Raumfrequenzen des Objektes aus. Im Falle einer fehlerfreien Pupillenfunktion wie in Gleichung (2.5), passieren bei einer kohärenten optischen Abbildung alle Frequenzen, für die

$$f_r^2 := f_x^2 + f_y^2 \leq \left(\frac{an}{\lambda R}\right)^2 = \left(\frac{NA}{\lambda}\right)^2$$

gilt, das optische System bis zur Bildebene. Alle anderen Frequenzen werden von der Pupillenfunktion gefiltert. Wir benutzen an dieser Stelle die sogenannte *normalisierte Frequenz*, welche definiert ist als

$$\boxed{\nu_{x,y} := \frac{\lambda}{NA} f_{x,y}} \quad , \quad (2.35)$$

wobei im Falle einer kohärenten Abbildung in Analogie zu Gleichung (2.13)

$$\nu^2 := \nu_x^2 + \nu_y^2 \leq 1$$

gilt. Wegen

$$\nu = \frac{\lambda}{NA} f_r = \frac{\lambda f}{na\rho} = \frac{\rho}{a}$$

kann die normalisierte Frequenz  $\nu$  auch als normalisierte Pupillenkoordinate interpretiert werden.

### 2.4.2. Inkohärente Optische Transferfunktion

Im Falle einer (total) inkohärenten linearen und translationsinvarianten optischen Abbildung kann die Intensität im Bild  $I_1(x_1, y_1)$  durch die Faltung der Intensität in der Objektebene  $I_0(x_0, y_0)$  mit der Intensitäts-PSF (siehe Gleichung (2.8)) berechnet werden:

$$I_1(x_1, y_1) = \iint_{-\infty}^{\infty} I_0(x_0, y_0) h(x_0 - x_1, y_0 - y_1) dx_0 dy_0 \quad (2.36)$$

Analog zur Beschreibung der kohärenten Abbildung, kann auch bei inkohärenter Abbildung der Effekt der Beugung der Lichtwellen an der Pupille durch einen linearen Tiefpass-Filter beschrieben werden:

$$\tilde{I}_1(f_x, f_y) = \tilde{I}_0(f_x, f_y) O(f_x, f_y) \quad (2.37)$$

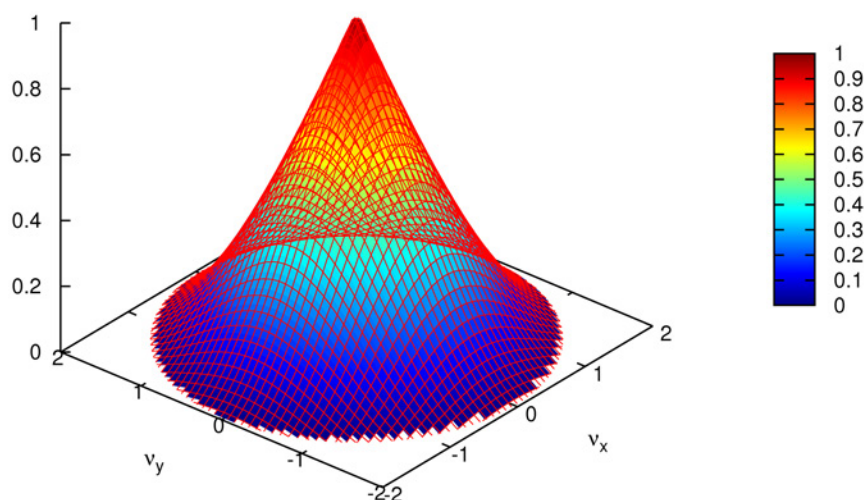
Aus dem Faltungstheorem und Gleichung (2.36) folgt

$$O(f_x, f_y) = \frac{1}{(\lambda R)^2} \iint_{-\infty}^{\infty} G(\xi' + \xi, \eta' + \eta) G^*(\xi', \eta') d\xi' d\eta' \quad (2.38)$$

Die Funktion  $O(f_x, f_y)$  ist als *Optische Transferfunktion* (kurz: OTF) bekannt und ist gegeben durch die Autokorrelation der Pupillenfunktion  $G(\xi, \eta)$  bzw. durch die Fourier-Transformierte der Intensitäts-PSF. Damit ist der Träger der OTF doppelt so breit wie der Träger der Pupillenfunktion. Das heißt, bei einer inkohärenten optischen Abbildung passieren alle Frequenzen das optische System, für die

$$\nu = \sqrt{\nu_x^2 + \nu_y^2} \leq 2$$

gilt. Diese Tatsache ist äquivalent zu Gleichung (2.14). Die OTF für eine fehlerfreie Abbildung mit einer kreisförmigen Apertur ist in Abbildung 2.9 gezeigt. Der Frequenzbetrag von  $\nu = 2$  wird in der englischsprachigen Literatur oft als *cut-off-frequency* bezeichnet, da sie den Träger der OTF definiert. Für eine fehlerfreie Abbildung ( $\Phi(\xi, \eta) \equiv 0$ ) ist die Pupillenfunktion



**Abb. 2.9.:** Optische Transferfunktion (OTF) für ein fehlerfreies, beugungsbegrenztes optisches System. Die Einheiten in  $x$  und  $y$ -Richtung entsprechen den normalisierten Frequenzen  $\nu_x$  und  $\nu_y$ .

reell und daher auch die OTF. Nimmt man für die Pupille eine Kreisfunktion an, so ist die OTF gegeben durch die Autokorrelation der Kreisfunktion, welche sich folgendermaßen schreiben lässt [Goo96]:

$$O(\nu) = \frac{2}{\pi} \left[ \arccos\left(\frac{\nu}{2}\right) - \frac{\nu}{2} \sqrt{1 - \left(\frac{\nu}{2}\right)^2} \right]$$

Im Allgemeinen ist die OTF eine komplexwertige Funktion und kann daher folgendermaßen zerlegt werden:

$$O(v_x, v_y) = \underbrace{|O(v_x, v_y)|}_{MTF(v_x, v_y)} \underbrace{\exp(i \arg(O(v_x, v_y)))}_{\exp(iPTF(v_x, v_y))}$$

MTF ist eine Abkürzung für die so genannte *Modulations-Transferfunktion*. Anschaulich bestimmt sie den Kontrastwert, der bei Abbildung eines Gitters mit einer bestimmten Frequenz durch das optische System erreicht werden kann. PTF ist eine Abkürzung für die *Phasen Transferfunktion*. Im Fall einer fehlerfreien beugungsbegrenzten Abbildung ist die Intensitäts-PSF punktsymmetrisch. Auch daraus folgt bereits, dass die OTF in diesem Fall reell und die PTF konstant gleich null sein muss. In diesem Fall stimmt die OTF bis auf das Vorzeichen mit der MTF überein. Die PTF ist daher nur bei Betrachtung optischer Fehler von Interesse. Da die Intensitäts-PSF immer eine reelle Funktion ist, ist die OTF immer punktsymmetrisch um den Ursprung.

### 2.4.3. Beschreibung der defokussierten OTF mit der Fehlerfunktion

Für den Fall einer optischen Abbildung, die mit Fehlern behaftet ist, können diese auch hier mit Hilfe der Fehlerfunktion  $\Phi(\xi, \eta)$  berücksichtigt werden. Setzt man wie in Gleichung (2.32) die Fehlerfunktion gleich dem Defokusterm  $\Phi_d = -\frac{1}{2}k \left(\frac{va}{f}\right)^2 z$  und setzt  $G(\xi, \eta)$  in (2.38) ein, so kann die OTF auch für eine defokussierte Abbildung ( $z \neq 0$ ) berechnet werden. Auf diese Weise ergibt sich eine dreidimensionale OTF, das heißt eine Funktion  $O(v_x, v_y, z)$ . Falls außer dem Defokus kein anderer optischer Defekt vorliegt, ist die Pupillenfunktion symmetrisch bzgl. der Rotation um die  $z$ -Achse. Dasselbe gilt für die PSF und die OTF. Da die defokussierte PSF somit auch punktsymmetrisch ist, ist die OTF mit Defokus, also  $O(v_x, v_y, z)$  für alle Werte von  $z$  eine reelle Funktion. Da die OTF auch symmetrisch bzgl. der Rotation um die  $z$ -Achse ist, reicht es hier die Funktion  $O(v, z)$  zu betrachten. Das Integral in (2.38) lässt sich analytisch lösen, allerdings ist die Lösung sehr unhandlich und wenig anschaulich. Eine deutlich einfachere Näherung findet sich z.B. in [Sto69]

$$O(v, z) \approx \begin{cases} 2(1 - 0.69v + 0.0076v^2 + 0.043v^3) \frac{J_1\left(-\frac{1}{2}k\left(\frac{a}{f}\right)^2 z[2v(1-0.5v)]\right)}{-\frac{1}{2}k\left(\frac{a}{f}\right)^2 z[2v(1-0.5v)]}, & \text{falls } v \leq 2 \\ 0, & \text{sonst} \end{cases} \quad (2.39)$$

Die OTF in Gleichung (2.39) ist in Abbildung 2.10(a) für verschiedene Defokussierungen  $z$  gezeigt. Wie im Abschnitt 2.3 beschrieben, ist der Defokusterm  $-\frac{1}{2}k \left(\frac{a}{f}\right)^2 z$  in dem Bruch in

Gleichung (2.39) eine Näherung, die nur für kleine Winkel bzw. kleine Aperturen gültig ist. In dem Beispiel in Abbildung 2.10 wurde von einem 10x Objektiv ( $f = 16\text{mm}$ ) mit einer NA von 0,25 und Luftimmersion ( $n = 1$ ) ausgegangen. Das entspricht einem Öffnungswinkel  $\alpha$  von etwa  $14.5^\circ$ . Der Ausdruck  $z - \frac{1}{2} \left(\frac{a}{f}\right)^2 z$  entspricht anschaulich dem Weglängenunterschied ( $s - f$ ), der sich am Rand der Pupille ( $\rho = a$ ) für eine bestimmte Defokussierung  $z$  ergibt. Für große Aperturen kann dieser Weglängenunterschied in Gleichung (2.39) (ähnlich wie in Gleichung (2.17)) mit

$$(s - f) = -f - z \cos(\alpha) + \sqrt{f^2 + 2fz + z^2 \cos^2(\alpha)} \quad (2.40)$$

wie in [Sto69] angegeben berechnet und in Gleichung (2.39) eingesetzt werden. Entsprechend berechnete OTFs für verschiedene Defokussierungen  $z$  sind in Abbildung 2.11(a) gezeigt. In dem Beispiel in Abbildung 2.11 wurde von einem 60x Objektiv ( $f \approx 2,7\text{mm}$ ) mit einer NA von 1,45 mit Ölimmersion ( $n = 1,518$ ) ausgegangen. Der Öffnungswinkel  $\alpha$  beträgt hier also etwa  $72,8^\circ$ . In beiden Beispielen wurde für die Vakuumwellenlänge  $\lambda = 491\text{nm}$  angenommen.

#### 2.4.4. Kontrastverlauf bei inkohärenter Abbildung periodischer Muster

Die Werte der defokussierten OTF entsprechen anschaulich dem Kontrast der bei der optischen Abbildung eines periodischen Musters (d.h. einer periodisch modulierten Intensität mit einem Kontrast von 100%)

$$I(x, y) = I_0 + I_0 \cos\left(2\pi \frac{\text{NA}}{\lambda} \nu_g x\right)$$

einer bestimmten Frequenz  $\nu_g$  im Abstand  $z$  von der Fokusebene erreicht wird. O.B.d.A. wurde hier die Frequenz des Musters in  $x$ -Richtung gewählt. Die negativen Werte in Abbildung 2.11(a) bzw. 2.10(a) bedeuten hierbei eine Invertierung des Gitterbildes, d.h. die Maxima des Gitterbildes in der defokussierten Ebene liegen gerade dort, wo in der Fokusebene die Minima liegen und umgekehrt. Weiterhin sieht man in Abbildung 2.11(a) bzw. 2.10(a), dass bei einer bestimmten Defokussierung nicht alle Frequenzen gleichermaßen an Kontrast verlieren. In Abbildung 2.11(b) und 2.10(b) sind die entsprechenden vollen Halbwertsbreiten der Kontraste in  $z$ -Richtung aufgetragen. Man sieht, dass der Kontrast der Frequenz mit  $\nu = 1$  am empfindlichsten auf eine bestimmte Defokussierung reagiert bzw. am schnellsten mit dem

Defokus  $z$  abfällt. Ausgehend von Gleichung (2.39) ( $J_1(x)/x = 1/2$  für  $x \approx 2.25$ ) erhält man für kleine Winkel eine Abschätzung für die volle Halbwertsbreite des Kontrastes bei  $\nu = 1$ :

$$\boxed{FWHM(\nu_g = 1) \approx 1.42 \frac{n\lambda}{NA^2}} \quad (2.41)$$

### 2.4.5. Kohärente Abbildung periodischer Muster

In der Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung kann die inkohärente Abbildung des periodischen Musters auf die Probe durch den linearen Tiefpass-Filter der OTF  $O(\nu_x, \nu_y, z)$  beschrieben werden, wobei sich (siehe Gleichung (2.39)) für jede Frequenz in  $z$ -Richtung näherungsweise ein  $\text{jinc}(x)$ -förmiger Kontrastverlauf ergibt. Für  $\nu_g = 1$  ergibt sich der schnellste Abfall des Kontrastes in  $z$ -Richtung. Für  $\nu_g = 0$  bzw.  $\nu_g = 2$  ist der Wert von  $O(\nu_x, \nu_y, z)$  in  $z$ -Richtung konstant gleich 1 bzw. 0. Für die null-Frequenz folgt das bereits aus der Energieerhaltung, denn der Wert der OTF an der null-Frequenz für einen bestimmten Wert  $z$  entspricht dem Integral über die PSF über diese Ebene.

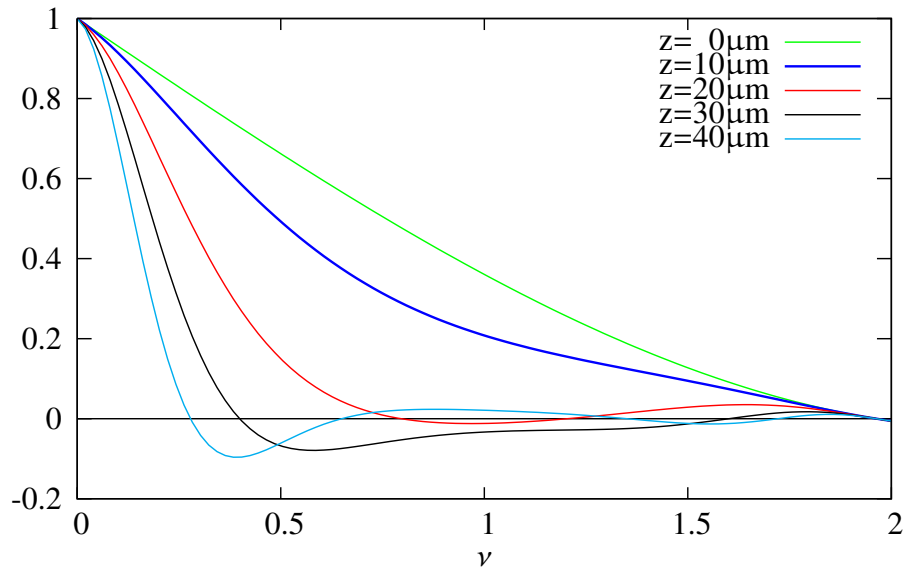
Bei der Abbildung eines periodischen Musters mit kohärentem Licht kann wie in Abschnitt 2.4 beschrieben ein periodisch moduliertes Amplitudenmuster wie z.B.

$$U_0(x, y) = A_0 + 2A_1 \cos(2\pi f_g x) = A_0 + A_1 e^{i2\pi f_g x} + \underbrace{A_{-1}}_{=A_1} e^{-i2\pi f_g x} \quad (2.42)$$

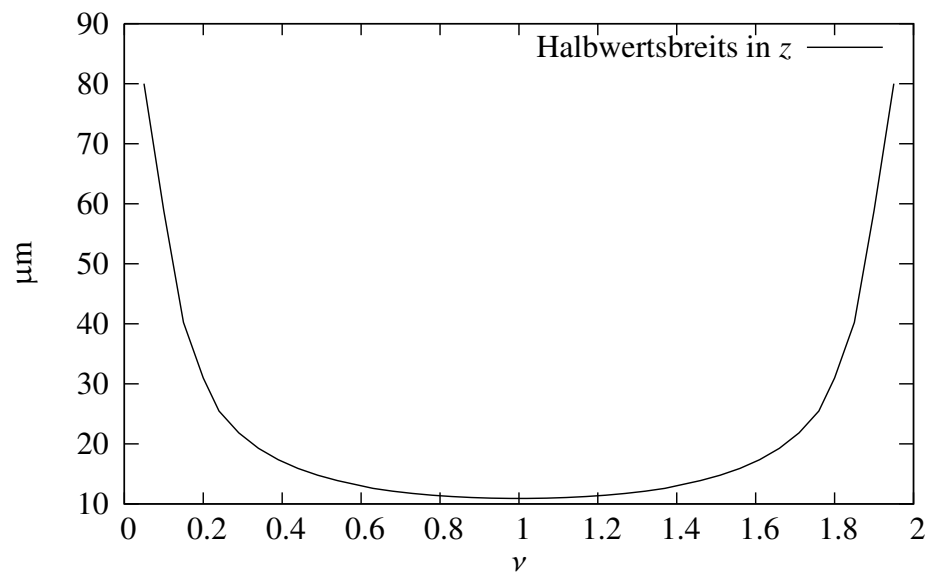
der Frequenz  $\nu_g$  bzw. Periode  $p_g$  betrachtet werden (es gilt wieder  $f_g = 1/p_g$ ).  $A_0$  bezeichnet die Amplitude der 0.,  $A_{\pm 1}$  die Amplitude der  $\pm 1$ . Beugungsordnung. Im folgenden wird angenommen, dass die interferierenden Wellen aller Beugungsordnungen die selbe Amplitude haben, d.h.  $A_{\pm 1} = A_0$ . Die Fourier-Transformierte dieser Funktion

$$\tilde{U}_0(k_x, k_y) = \left( \frac{1}{2\pi} \right)^2 A_0 \left( \delta(k_x) \delta(k_y) + \delta(k_x - 2\pi f_g) \delta(k_y) + \delta(k_x + 2\pi f_g) \delta(k_y) \right)$$

wird mit der Pupillenfunktion  $G(\rho, \theta, z)$  aus Gleichung (2.32) gefiltert, wobei der Ausdruck  $-\frac{1}{2}i \left( \frac{\rho}{f} \right)^2$  bei großen Aperturen wie im Beispiel in Abbildung 2.11 durch den in Gleichung (2.40) ersetzt werden muss. Falls die Frequenz  $f_g$  innerhalb des Trägers der Pupillenfunktion liegt, d.h. ( $f_g \leq \frac{NA}{\lambda}$ ), so ist die Amplitude nach dem Tiefpassfilter mit der defokussierten

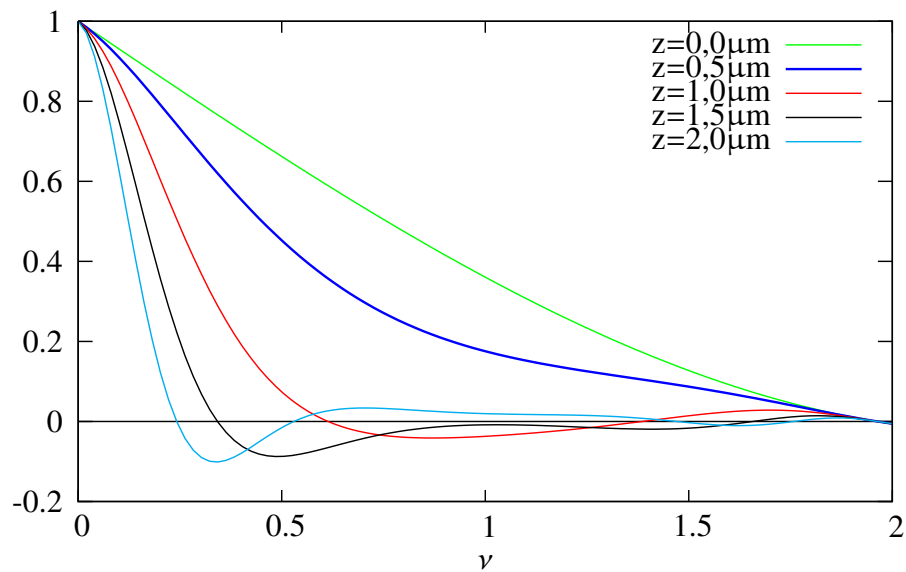


(a) Verlauf der OTF für verschiedene Defokussierungen  $\delta z$  in  $\mu\text{m}$  gemäß Gleichung (2.39).

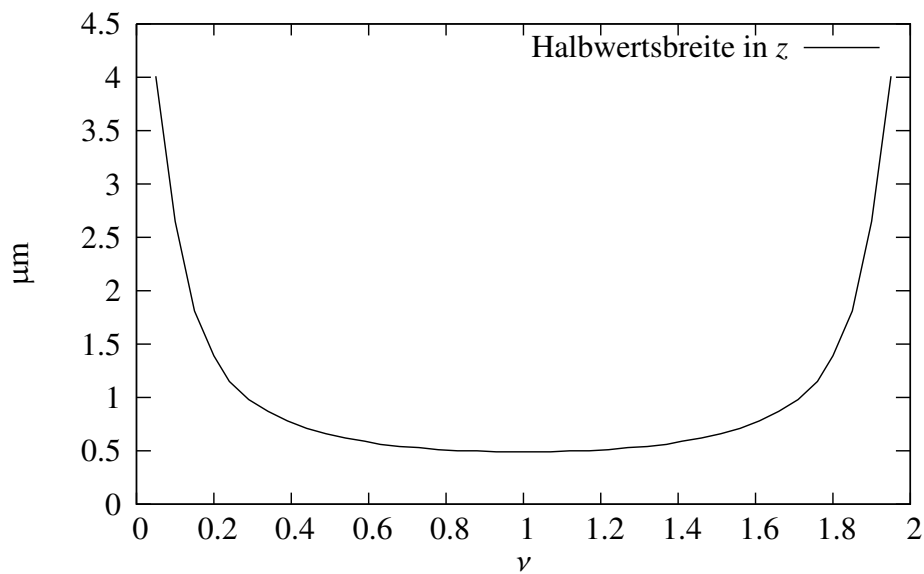


(b) Halbwertsbreiten der OTF (a) in  $\delta z$ -Richtung. Die minimale Halbwertsbreite bei  $\nu = 1$  beträgt  $10,9\mu\text{m}$

**Abb. 2.10.:** Beispiel für die defokussierte OTF  $O(\nu, z)$ . Für die Berechnung der Graphen wurde ein 10x Luftimmersions-Objektiv mit einer NA von 0,25 und eine Vakuumwellenlänge von  $491\text{nm}$  angenommen.



(a) Verlauf der OTF für verschiedene Defokussierungen  $\delta z$  in  $\mu\text{m}$  gemäß Gleichung (2.39), wobei der Weglängenunterschied  $(s - f)$  hier gemäß Gleichung (2.40) berechnet wurde.



(b) Halbwertsbreiten der OTF (a) in  $\delta z$ -Richtung. Die minimale Halbwertsbreite bei  $\nu = 1$  beträgt  $490\text{nm}$

**Abb. 2.11.:** Beispiel für die defokussierte OTF  $O(\nu, z)$ . Für die Berechnung der Graphen wurde ein 60x Ölimmersions-Objektiv mit einer NA von 1,45 und eine Vakuumwellenlänge von  $491\text{nm}$  angenommen.



Pupillenfunktion für kleine Aperturen bzw. kleine Beugungswinkel ( $\lambda \ll p$ ) näherungsweise gegeben durch

$$\tilde{U}_1(k_x, k_y, z) = \left(\frac{1}{2\pi}\right)^2 A_0 \left[ \delta(k_x)\delta(k_y) + e^{-i\pi\frac{\lambda}{n}f_g^2 z} \left( \delta(k_x - 2\pi f_g) + \delta(k_x + 2\pi f_g) \right) \right] \quad (2.43)$$

(vgl. Gleichung (2.34)). Die Transformation ins Bild ergibt dann

$$U_1(x, y, z) = A_0 + 2A_0 e^{-i\pi\frac{\lambda}{n}f_g^2 z} \cos(2\pi f_g x) \quad (2.44)$$

Berechnet man die sich ergebende Intensität aus dem Betragsquadrat von Gleichung (2.44), so erhält man:

$$I_1(x, y, z) = 3I_0 + 4I_0 \cos\left(\pi\frac{\lambda}{n}f_g^2 z\right) \cos(2\pi f_g x) + 2I_0 \cos(4\pi f_g x) \quad , \quad (2.45)$$

wobei  $I_0^2 = |A_0|^2$ . Aus Gleichung (2.45) sieht man, dass die Intensitätsverteilung  $I_1(x, y, z)$  drei Frequenzen enthält: Die null-Frequenz, die Grundfrequenz  $f_g$  mit der auch die Amplitude moduliert war, und die doppelte Grundfrequenz  $2f_g$ . Weiterhin ist nur der Anteil mit der Grundfrequenz  $f_g$  von  $z$  abhängig. Die Intensitätsverteilung  $I_1(x, y, z)$  ist periodisch in  $z$ , bzw. das Bild des Musters  $I_1(x, y, z)$  kann auch in defokussierten Ebenen  $z \neq 0$  mit vollem Kontrast gemessen werden. Falls  $z = \frac{n}{\lambda f_g^2} = \frac{np^2}{\lambda}$  nimmt die Kosinusfunktion mit der  $z$ -Abhängigkeit in Gleichung (2.45) den Wert  $-1$  an, was einem invertierten Bild des Musters der Grundfrequenz entspricht. Der Effekt der Selbstabbildung des Musters im Bereich um den Fokus herum ist bekannt als *Talbot-Effekt*<sup>5</sup>. Sowohl  $I_1(x, y, z)$  als auch  $U_1(x, y, z)$  sind periodisch in  $z$  mit einer Periode

$$L_{\text{Talbot}} = \frac{2np^2}{\lambda} \quad . \quad (2.46)$$

Die Periode ist als *Talbot-Distanz* bekannt. Gleichung (2.46) stimmt entsprechend der Näherung in Gleichung (2.43) nur näherungsweise für kleine Beugungswinkel. Für große Winkel ergibt sich stattdessen

$$L_{\text{Talbot}} = \frac{\lambda/n}{1 - \sqrt{1 - \frac{\lambda^2}{n^2 p^2}}} \quad .$$

Für weitere Details zum Talbot-Effekt, siehe z.B. [Edg69]. Im Gegensatz zur inkohärenten Abbildung eines periodischen Musters, ergibt sich im kohärenten Fall für die Grundfrequenz also ein kosinusförmiger Kontrastverlauf in  $z$ -Richtung. Entsprechend Gleichung (2.41) findet man auch hier eine Abschätzung für die volle Halbwertsbreite des Kontrastes bei kleinen

<sup>5</sup>William Henry Fox Talbot(\*11.02.1800, †17.09.1877)

Winkeln:

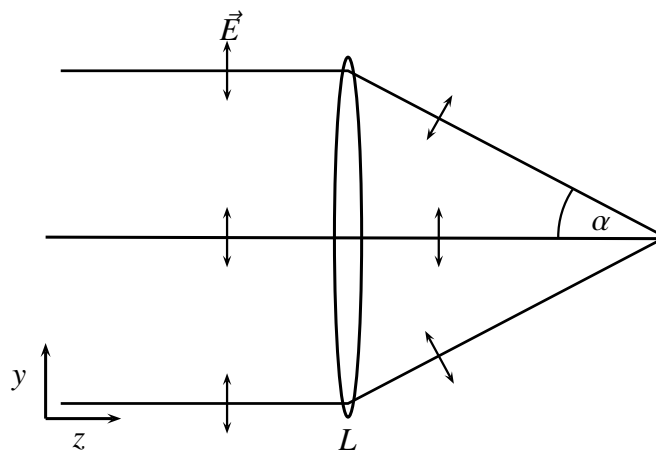
$$FWHM(\nu) \approx \frac{2n\lambda}{3NA^2\nu^2}$$

Die minimale Halbwertsbreite in  $z$ -Richtung ergibt sich also bei der größten Frequenz, die noch die Pupille des optischen Systems passieren kann, d.h. für  $\nu = 1$  bzw.  $p = \frac{\lambda}{NA}$ :

$$FWHM(\nu = 1) \approx 0.67 \frac{n\lambda}{NA^2} \quad (2.47)$$

Ein Vergleich mit Gleichung (2.41) zeigt, dass die Halbwertsbreite des Kontrastes in  $z$  für die Grundfrequenz  $\nu = 1$  im Fall kohärenter Beleuchtung weniger als der Hälfte der entsprechenden Halbwertsbreite bei inkohärenter Beleuchtung beträgt.

### 2.4.6. Polarisation



**Abb. 2.12.:** Skizze zum Einfluss der Polarisation bei der kohärenten Bildentstehung eines Gitters. Die Brechung der Wellen an den Flächen der Objektivlinse  $L$  ändert die Orientierung der elektrischen Feldstärkevektoren.

Bei der kohärenten Abbildung bzw. Erzeugung periodischer Muster muss aufgrund der Interferenz der Beugungsordnungen die Polarisation mitberücksichtigt werden. Bei der Rekombination der Beugungsordnungen mit einer Linse (oder einem Objektiv), werden wie in Abbildung 2.12 die elektrischen Feldvektoren der Beugungsordnungen aufgrund der Brechung an den Flächen der Linse  $L$ , jeweils um den Beugungswinkel  $\alpha$  senkrecht zur Zeichenebene in Abbildung 2.12 rotiert [For10]. Für Details hierzu siehe Abschnitt K. Geht man von linearer Polarisation aus, so lässt sich der elektrische Feldvektor vor der Brechung an den Flächen der

Linse  $L$  schreiben als

$$\vec{E} = E_0 \begin{pmatrix} \cos(\chi) \\ \sin(\chi) \\ 0 \end{pmatrix} .$$

Der Feldvektor für die erste Beugungsordnung nach der Brechung lässt sich dann durch die Gleichungen (K.6) bzw. (K.7) und (K.8) mit  $\theta_1 = 0$  ermitteln. Die Intensität in Gleichung (2.45) lässt sich für  $z = 0$  in Fourier-Darstellung schreiben:

$$I(x) = \sum_{m=-3}^3 c_m e^{-ik_m x_m} .$$

Die Koeffizienten  $c_m$  der Fourier-Darstellung der Intensität unter Berücksichtigung der Polarisation lassen sich dann entsprechend Gleichung (K.14) ermitteln. Insgesamt erhält man auf diese Weise

$$c_0 = 3I_0 \quad (2.48)$$

$$c_1 = 2I_0(\cos^2(\chi) \cos(\alpha) + \sin^2(\chi)) \quad (2.49)$$

$$c_2 = I_0(\cos^2(\chi) \cos(2\alpha) + \sin^2(\chi)) \quad (2.50)$$

Steht der elektrische Feldvektor vor der Beugung an der Struktur senkrecht auf dem Frequenzvektor der Struktur ( $\chi = 90^\circ$ , bzw. s-Polarisation), so ergeben sich dieselben Koeffizienten, die man ohne Berücksichtigung der Polarisation erhalten hätte, weil die elektrischen Feldstärkevektoren in diesem Fall nicht durch die Brechung an den optischen Flächen des Objektivs verändert werden. Der Verlauf der Koeffizienten aus Gleichungen (2.49) und (2.50) sind grafisch in Abbildung 2.13 gezeigt. Für weitere Details zum Einfluss der Polarisation bei Abbildung periodischer Muster speziell bei Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung siehe z.B. [O'H12].

### 2.4.7. Die Dreidimensionale OTF

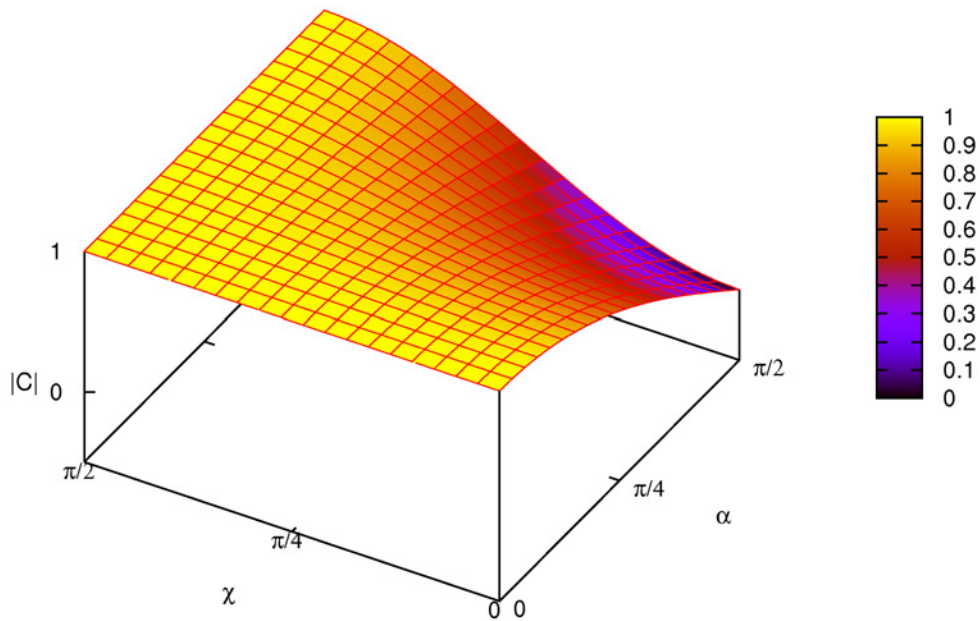
Die OTF mit Defokus  $O(v_x, v_y, z)$  (bzw.  $O(v, z)$ ) lässt sich, wie in Abbildung 2.14 gezeigt auch dreidimensional darstellen. Die dreidimensionale PSF ergibt sich aus der Funktion  $O(v_x, v_y, z)$  bzw.  $O(f_x, f_y, z)$  durch inverse Fourier-Transformation in  $v_x$  und  $v_y$  Richtung.

$$h(x, y, z) \propto \iint df_x df_y e^{-i2\pi(f_x x + f_y y)} O(f_x, f_y, z) \quad (2.51)$$

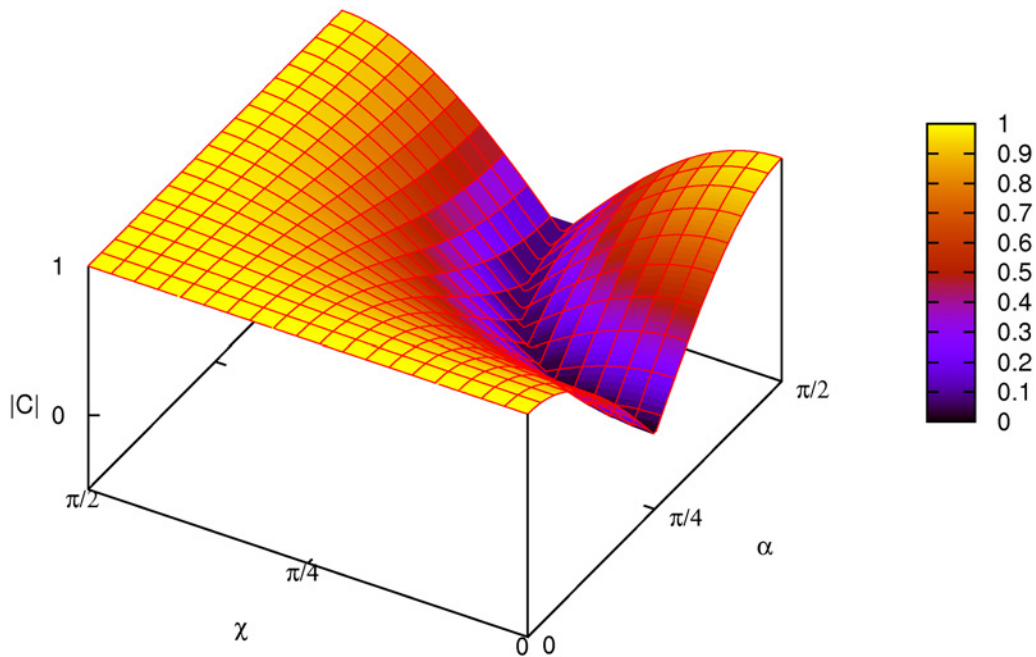
Auch in drei Dimensionen kann die inkohärente optische Abbildung durch Faltung der Intensitätsverteilung im Objekt  $I_0(x, y, z)$  mit der dreidimensionalen Intensitäts-PSF  $h(x, y, z)$  beschrieben werden. Dementsprechend ergibt sich die dreidimensionale OTF  $O(\nu_x, \nu_y, \nu_z)$  bzw.  $O(f_x, f_y, f_z)$  aus der Fourier-Transformation der Funktion  $O(f_x, f_y, z)$  in  $z$ -Richtung:

$$O(f_x, f_y, f_z) = \frac{1}{2\pi} \int dz e^{i2\pi f_z z} O(f_x, f_y, z) \quad (2.52)$$

Der Informationsverlust bei einer linearen translationsinvarianten optischen Abbildung lässt sich dementsprechend auch in drei Dimensionen mit der dreidimensionalen OTF als Tiefpass-Filter beschreiben. Statt der Frequenzen  $(f_x, f_y, f_z)$  ist es auch üblich, stattdessen  $k_x = 2\pi f_x$ ,  $k_y = 2\pi f_y$  und  $k_z = 2\pi f_z$  für die Frequenzen des Objekts zu benutzen. Hiervon wird auch im Folgenden Gebrauch gemacht. Der Träger der dreidimensionalen OTF  $O(k_x, k_y, k_z)$  (kurz *3D-OTF*) ist in Abbildung 2.15 gezeigt. Anschaulich entspricht er der Menge der Frequenzen in drei Dimensionen, die ein linear translationsinvariantes optisches System passieren können. Für  $\nu = 1$  hat der Träger der 3d-OTF in  $k_z$ -Richtung den größten Durchmesser. Für die Frequenz  $\nu = 0$  und  $\nu = 2$  ist die Funktion  $O(\nu_x, \nu_y, z)$  in  $z$ -Richtung konstant. Dementsprechend ist die 3d-OTF bei  $\nu = 0$  bzw.  $\nu = 2$  nur für  $k_z = 0$  von null verschieden. Die fehlenden Informationen bei  $\nu = 0$  und  $|k_z| > 0$  werden in der englischsprachigen Fachliteratur oft als *missing cone* bezeichnet.

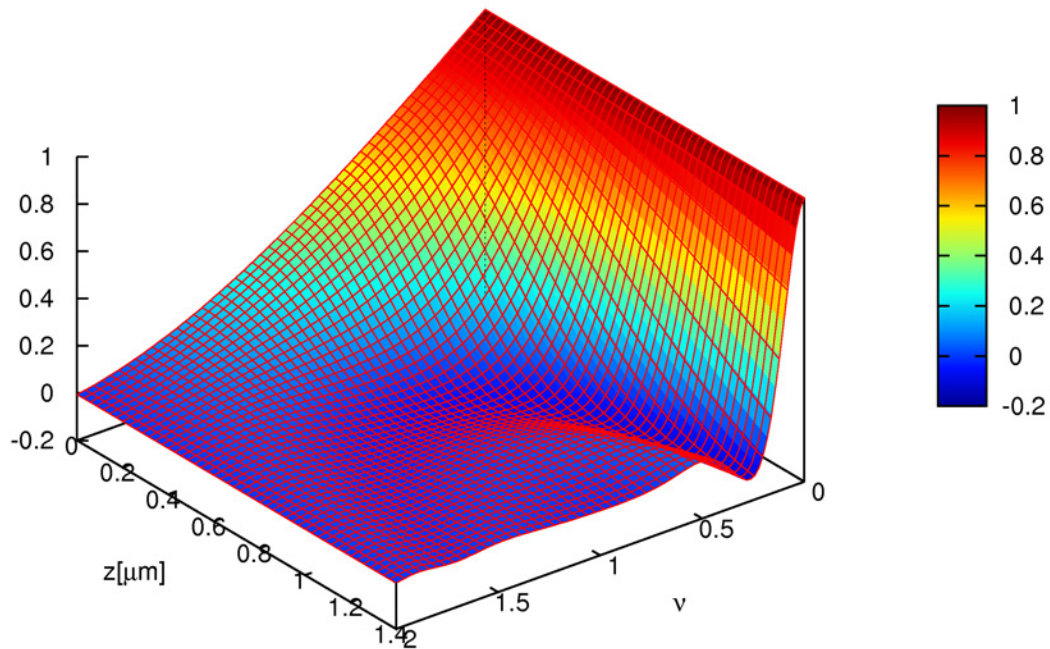


(a) Grafische Darstellung des Koeffizienten  $c_1$  der Musterintensität aus Gleichung (2.49) als Funktion des Beugungswinkels  $\alpha$  und des Polarisationswinkels  $\chi$ .

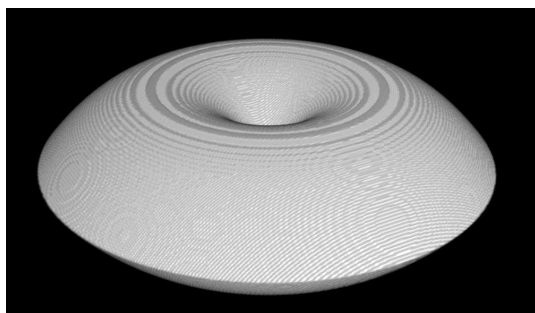


(b) Grafische Darstellung des Koeffizienten  $c_2$  der Musterintensität aus Gleichung (2.50).

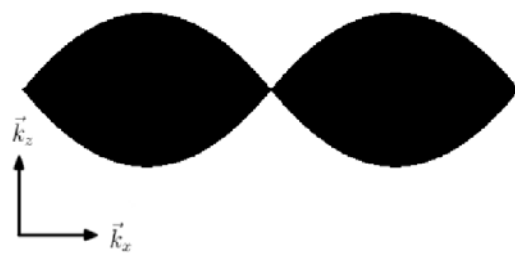
**Abb. 2.13.:** Grafische Darstellung der Koeffizienten der Fourier-Darstellung der Musterintensität  $c_1$  und  $c_2$  aus Gleichungen (2.49) und (2.50). Die Koeffizienten wurden jeweils auf die Werte normiert, die man ohne Berücksichtigung der Polarisation erhalten hätte.



**Abb. 2.14.:** 3D Darstellung der OTF (Gleichung (2.39)), wie sie auch in Abbildung (2.11) gezeigt ist. Die minimale Halbwertsbreite der OTF in  $z$ -Richtung liegt bei  $v = 1$ .



(a) Dreidimensionale Darstellung.



(b) Schnitt durch die  $x - z$ -Ebene.

**Abb. 2.15.:** Darstellungen des Trägers der 3d-OTF.

### 3. Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopie ist eine spezielle Form der Lichtmikroskopie. Hierbei wird ein fluoreszenter Farbstoff (Fluorophor oder auch Fluorochrom) mit einer bestimmten Wellenlänge  $\lambda$  angeregt. Nach einigen wenigen Nanosekunden erfolgt typischerweise die Emission, deren Wellenlänge größer ist als die Anregungswellenlänge  $\lambda^{\text{exc.}}$ . Die Rotverschiebung der emittierten Strahlung gegenüber der Anregung wird nach deren Entdecker als *Stokes-Verschiebung*<sup>1</sup> bezeichnet. Neben den Fluoreszenz-Prozessen bei denen pro emittierten Photon ein einzelnes Photon zur Anregung absorbiert wird, gibt es noch Fluoreszenz mit *Zwei-Photon-* bzw. allgemein *Multiphoton-Anregung*. In der Mikroskopie wird die Multiphoton-Anregung seit 1990 benutzt [Den90]. Im Folgenden wird immer von linearer Einphoton-Anregung ausgegangen, d.h. die emittierte Intensität hängt linear von der Anregungsintensität ab.

Fluoreszenzmikroskope werden heute üblicherweise als Auflichtmikroskope gebaut und daher als *Auflichtfluoreszenzmikroskop* oder auch als *Epifluoreszenzmikroskop* bezeichnet. In Abbildung 3.1 ist der schematische Aufbau eines Epifluoreszenzmikroskops gezeigt: Im Fall inkohärenter Lichtquellen (in Abbildung 3.1 als LQ bezeichnet), werden oft Lampen mit hoher Leuchtstärke verwendet, welche über den gesamten sichtbaren Spektralbereich emittieren. Seit einigen Jahren, werden auch *LEDs* als Lichtquellen benutzt. In der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie, die in Abschnitt 3.1 behandelt wird, werden meist *LASER* als Lichtquellen genutzt.

Durch den Anregungsfilter transmittiert in jedem Fall nur Licht der Wellenlänge  $\lambda$ . Der dichroitische Spiegel (DS) reflektiert Licht der Wellenlänge  $\lambda^{\text{exc.}}$  und transmittiert Licht mit der Emissionswellenlänge  $\lambda^{\text{em.}}$ . D.h. der Wellenlängenunterschied zwischen Anregung und Emission muss groß genug sein, um beide Anteile mit optischen Filtern trennen zu können. Der Emissionsfilter vor der Kamera lässt nur Licht der Emissionswellenlänge transmittieren.

Fluoreszenzmikroskopie bietet eine ganze Reihe von Anwendungen in der Biologie. Einige

---

<sup>1</sup>George Gabriel Stokes (\*13.08.1819, †01. 02. 1903)

Beispiele hierfür sind:

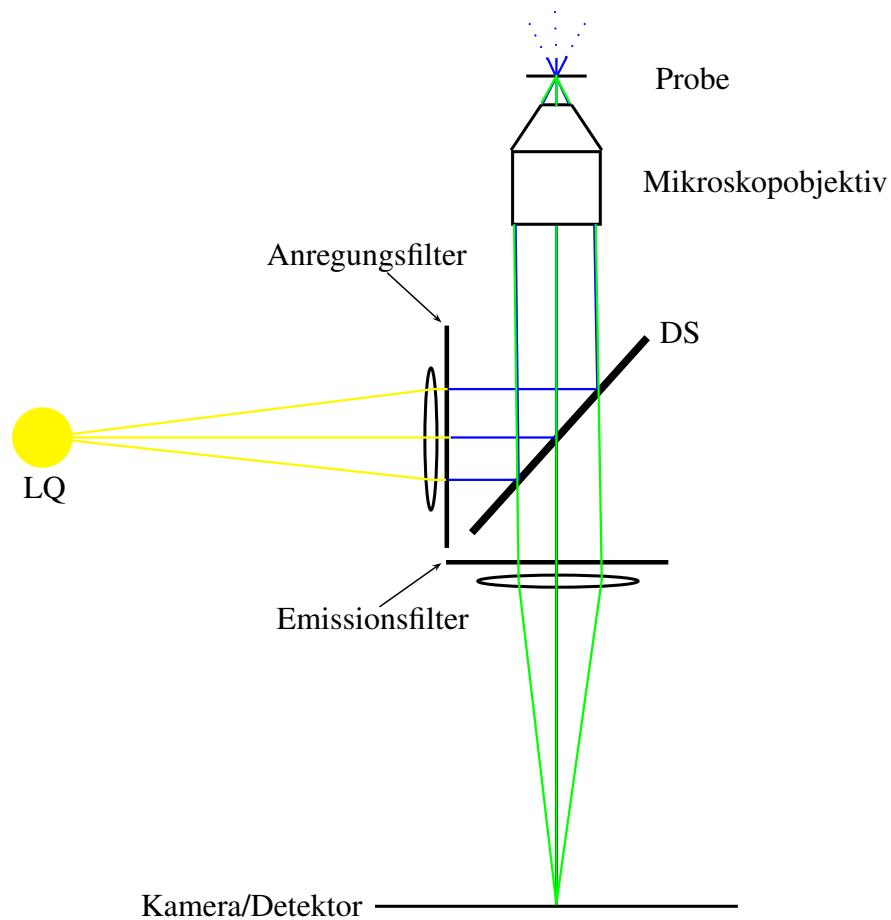
- Untersuchung von autofluoreszenten Objekten wie z.B. Chlorophylle
- Lokalisierung bestimmter Proteine innerhalb von Zellen
- Bestimmte Bestandteile von Zellen können mit fluoreszierenden Proteinen sichtbar gemacht werden, wie z.B.
  - das Cytoskelett von Zellen durch das Protein Aktin
  - Mikrotubuli durch das Protein Tubulin
- Unterschiede im pH-Wert innerhalb einer Zelle können durch sog. fluoreszierende *pH-Indikatoren* sichtbar gemacht werden.
- Antikörper können mit Fluorochromen gekoppelt werden, um biologische Strukturen sichtbar zu machen (Immunfluoreszenz).

Wie in der Skizze in Abbildung 3.1 angedeutet, wird in der Epifluoreszenzmikroskopie das Objektfeld *kritisch* beleuchtet, d.h. die Lichtquelle wird mit Hilfe eines Kondensors auf die Probe abgebildet. Hierbei wird in der Regel versucht eine möglichst gleichmäßige Ausleuchtung des gesamten Objektfelds zu erreichen. Die Anregung lässt sich allerdings nicht auf die eigentliche Fokusebene beschränken: Aufgrund der Energieerhaltung (vgl. Gleichung (2.23)) werden auch Ebenen außerhalb der eigentlichen Fokusebene zur Fluoreszenz angeregt.

Die dadurch verursachte *Ausserfokus-Emission* wird auf Ebenen vor bzw. hinter der Bildebene des Mikroskops abgebildet, d.h. sie gelangen als defokussierte Bilder der entsprechenden Probenebenen ins Bild. Diese sogenannte Ausserfokus-Detektion verschlechtert dadurch Bildkontraste und damit auch mikroskopische Auflösung sowohl in lateraler ( $x, y$ ) als auch in axialer ( $z$ ) Richtung [Con05]. Die qualitativen Auswirkungen der Ausserfokus-Detektion auf den Bildkontrast sind in Abbildung 3.3 an einem Beispiel gezeigt. Mit wachsender Probenstärke nimmt auch die Ausserfokus-Detektion zu, d.h. für dünne Proben ist die Ausserfokus-Fluoreszenz unproblematisch.

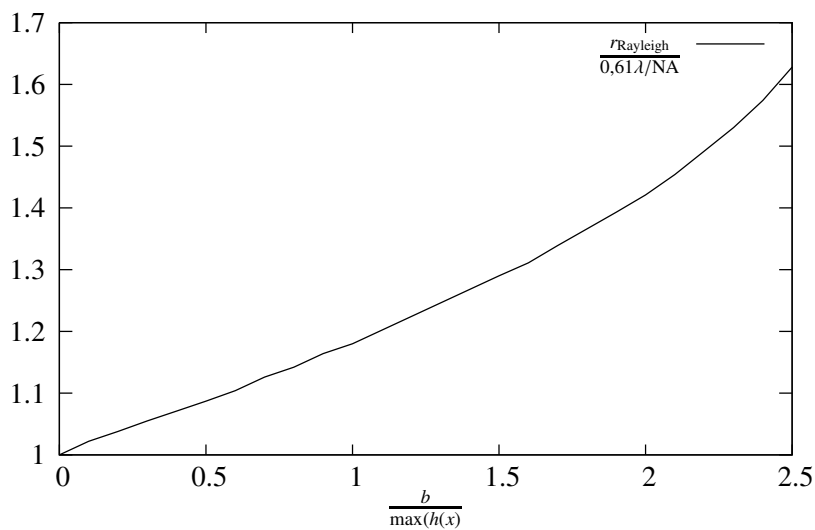
Die verschlechterte laterale Auflösung kann man leicht quantitativ abschätzen: Nimmt man wie in dem Beispiel in Abbildung 2.6 zwei (räumlich versetzte) Punktspreizfunktionen  $h_1(x)$





**Abb. 3.1.:** Schematische Skizze zum Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops.

und  $h_2(x)$  an und addiert ein konstantes Hintergrundsignal  $b$ , so ist das Rayleigh Kriterium erfüllt, wenn die Intensität genau zwischen den Maximas der einzelnen PSFs auf etwa 73,5% des maximalen Signals abfällt. In Abbildung (3.2) sind die sich so ergebenden Mindestabstände (normiert auf den Abstand  $0,61\lambda/NA$  ohne Hintergrundsignal) als Funktion des Hintergrundsignals dargestellt. Das Hintergrundsignal ist normiert auf die maximale Intensität der PSFs. Ist das normierte Hintergrundsignal  $b/\max(h(x))$  größer als 2,77, so kann das Rayleigh Kriterium nicht mehr erfüllt werden. Analoge Schlussfolgerungen lassen sich auch auf die axiale Auflösung übertragen.



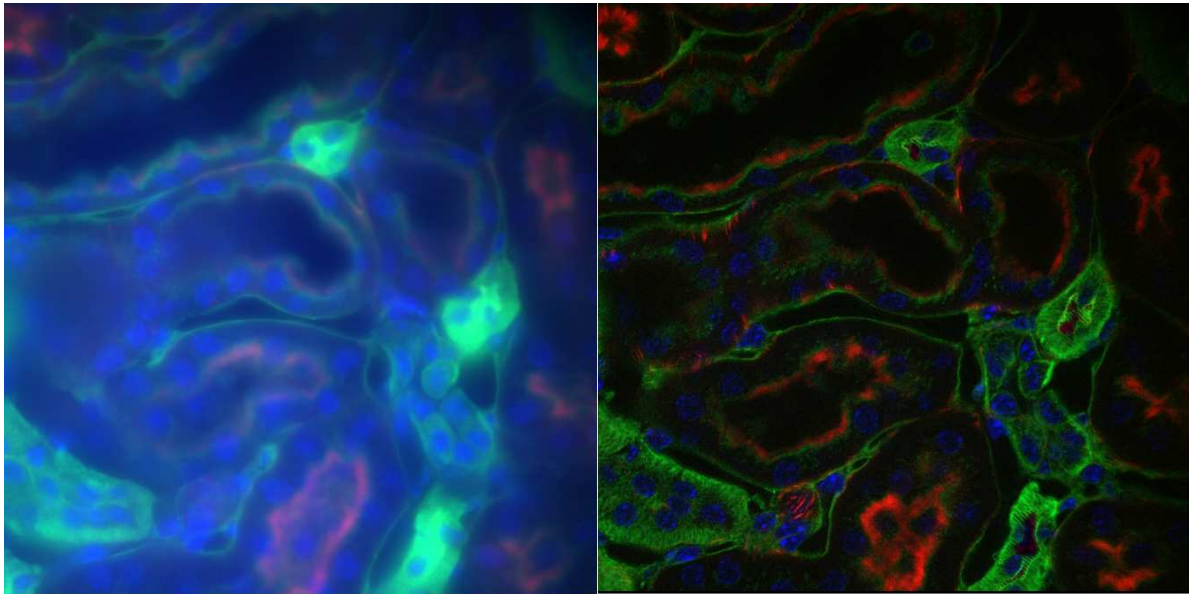
**Abb. 3.2.:** Mindestabstände zweier PSFs nach dem Rayleigh-Kriterium als Funktion eines konstanten, auf die Intensität der PSFs normierten Hintergrundsignals  $b / \max(h(x))$ .

## 3.1. Konfokale Mikroskopie

Aufgrund der beschriebenen negativen Effekte der Ausserfokus-Fluoreszenz auf das mikroskopische Bild, ist es wünschenswert die Ausserfokus-Detektion weitestgehend zu vermeiden. Diese Motivation führte zur Erfindung des *konfokalen* Mikroskops [Min61].

Das Prinzip eines konfokalen Mikroskops ist schematisch in Abbildung 3.4 gezeigt. Im Gegensatz zur oben beschriebenen Epifluoreszenzmikroskopie, wird im konfokalen Mikroskop üblicherweise nicht das gesamte Objektfeld gleichzeitig beleuchtet, sondern nur ein Ausschnitt davon, der in Abbildung 3.4 durch die Anregungsblende bestimmt ist. In der Zwischenbildebene vor dem Detektor befindet sich die Detektionsblende. Ebenen ober- bzw. unterhalb der Fokusebene des Mikroskopobjektivs werden vor bzw. hinter die Detektionsblende abgebildet. Auf diese Weise gelangt größtenteils nur Licht aus dem Fokusbereich des Mikroskopobjektivs auf den Detektor. Der Durchmesser der Detektionsblende beträgt üblicherweise wenige volle Halbwertsbreiten der PSF.

Um ein mikroskopisches Bild des gesamten Objektfeldes zu erhalten, muss der Anregungsbereich über das Objektfeld bewegt werden um die Probe abzutasten. Dies geschieht z.B. mit Hilfe eines beweglichen galvanometrischen Abtast-Spiegels. Wird die Emission über denselben Abtast-Spiegel auf den Detektor abgebildet, so bleibt die Position der Emission während des Abtastens der Probe in der Zwischenbildebene vor dem Detektor konstant. Man spricht in diesem Fall auch von *descanned detection*.

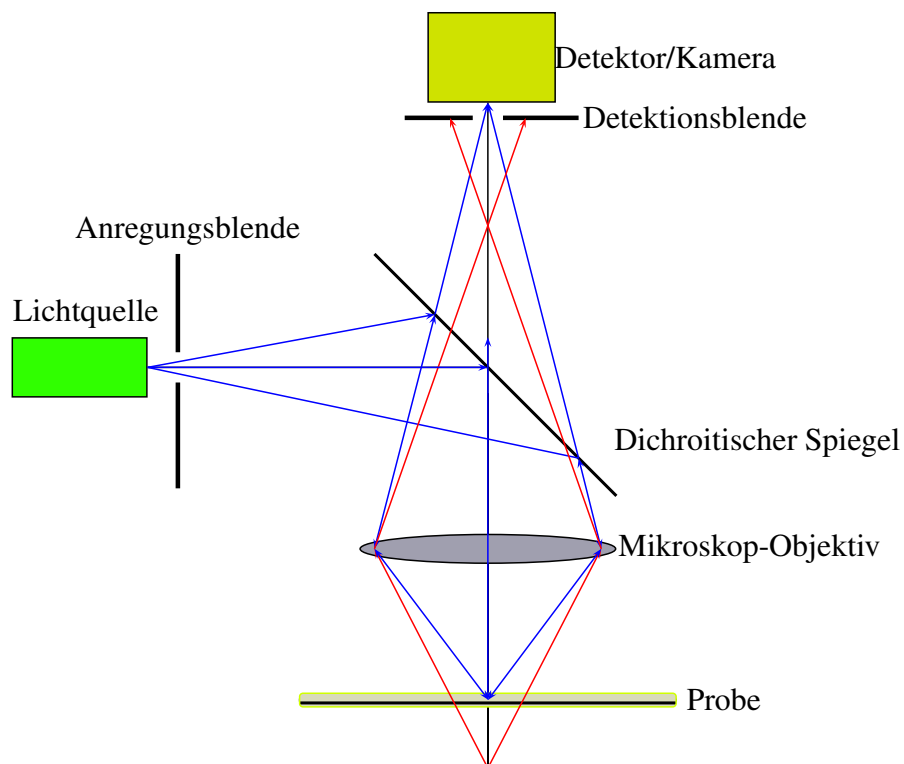


**Abb. 3.3.:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Mäuseniere mit drei Farbkanälen: Alexa Fluor® 488 WGA, Alexa Fluor® 568 Phalloidin und DAPI. Links in Weitfeld-Fluoreszenz, rechts mit Strukturierter Beleuchtung. Man sieht deutlich die Auswirkung der Ausserfokus-Fluoreszenz sowohl auf den (lateralen) Kontrast, als auch auf die Tiefenschärfe. Aufgenommen wurde mit einem 60x NA1.45 Ölimmersionobjektiv der Firma Olympus in der IMIC-Plattform der TILL-Photonics.

In neueren konfokalen Mikroskopen werden zur Anregung oft in Glasfasern eingekoppelte Laser zur punktförmigen Beleuchtung der Probe benutzt. Solche Mikroskope werden abgekürzt als CLSM (von engl.: *confocal laser scanning microscope*) oder auch als *Laserscanningmikroskop* bezeichnet.

Neben dem Abtasten mit nur einem Punkt, gibt es auch die Möglichkeit das Verfahren zu beschleunigen indem z.B. eine ganze Linie auf einmal belichtet wird. Hierbei wird Ausserfokus-Detektion nur in einer Richtung blockiert.

Eine weitere Möglichkeit konfokale mikroskopische Aufnahmen zu beschleunigen besteht in der Verwendung einer sog. *Nipkov-Scheibe*. Eine Nipkov-Scheibe enthält mehrere spiralförmig angeordnete Lochblenden, welche sowohl als Anregungs- als auch als Detektionsblenden dienen. Durch eine Rotation der Scheibe kann die Probe in sehr kurzer Zeit abgetastet werden. Diese Verfahren werden als *Spinning-Disc-Verfahren* bezeichnet. Aufgrund der simultanen Anregung und Detektion mehrerer Probenpunkte, besteht hier bei dicken Proben die Gefahr, dass durch einige Detektionsblenden auch (Ausserfokus-) Licht eines benachbarten Anregungspunktes gelangen kann. Man spricht in diesem Fall von *Cross-Talk*. Der Gewinn



**Abb. 3.4.:** Schematische Skizze des Prinzips der konfokalen Bildentstehung: Ebenen über- und unterhalb der Fokusebene werden vor bzw. hinter die Detektionsblende abgebildet. Dadurch wird ein Großteil der Ausserfokusdetektion von der Blende blockiert.

an Geschwindigkeit durch gleichzeitiges Abtasten mehrerer Probenpunkte verursacht so eine Reduzierung der möglichen messbaren Probendicken.

#### 3.1.1. Die Konfokalitätsfunktion

Bei der Epifluoreszenzmikroskopie ist die in Gleichung (2.23) definierte Funktion

$$\mathcal{K}(z) = \iint_{-\infty}^{\infty} dx dy I_{\text{PSF}}(x, y, z)$$

aufgrund der Energieerhaltung eine Konstante. Aufgrund dessen wird in einem nicht konfokalen Fluoreszenzmikroskop jegliche Fluoreszenz aus allen angeregten Ebenen der Probe auf den Detektor bzw. die Kamera transportiert. Im Gegensatz dazu, ist die effektive PSF  $h_{\text{CLSM}}$

bei einem konfokalen Laserscanningmikroskop gegeben durch

$$h_{\text{CLSM}}(\vec{x}_s, z) = h^{\text{exc.}}(-\vec{x}_s, z) \cdot \iint d^2x_{\perp} B(\vec{x}_{\perp}) h^{\text{em.}}(\vec{x}_{\perp} + \vec{x}_s, z) \quad (3.1)$$

Zur Herleitung von Gleichung (3.1), siehe Anhang C.1. Da für größer werdende Abstände  $z$  ein immer kleiner werdender Teil der Gesamtintensität von  $h^{\text{em.}}$  durch die Detektionsblende transmittiert, ist die Funktion  $\mathcal{K}(z)$  im Fall eines konfokalen Mikroskops nicht mehr konstant. Aus der Inversion von Gleichung (2.51)

$$O(f_x, f_y, z) = \iint dx dy e^{i2\pi(f_x x + f_y y)} h(x, y, z)$$

folgt, dass die Funktion  $\mathcal{K}(z)$  gegeben ist durch  $O(f_x = 0, f_y = 0, z)$ . Die Tatsache, dass die Funktion  $\mathcal{K}(z)$  im Epifluoreszenzmikroskop konstant ist, ist daher äquivalent zu dem in Abschnitt 2.4.7 beschriebenen *missing-cone* der dreidimensionalen optischen Transferfunktion  $O(f_x, f_y, f_z)$  in Gleichung (2.52).

Die Fouriertransformation von Gleichung (3.1) ergibt

$$O_{\text{CLSM}}(k_x, k_y, z) = \iint dk'_x dk'_y \tilde{B}(k'_x, k'_y) O_{\text{em.}}(k'_x, k'_y, z) O_{\text{exc.}}^*(k'_x - k_x, k'_y - k_y, z) \quad (3.2)$$

$$\begin{aligned} \Rightarrow \mathcal{K}_{\text{CLSM}}(z) &= O_{\text{CLSM}}(k_x = 0, k_y = 0, z) = \\ &= \iint dk'_x dk'_y O_{\text{em.}}(k'_x, k'_y, z) O_{\text{exc.}}^*(k'_x, k'_y, z) \tilde{B}(k'_x, k'_y) \end{aligned} \quad (3.3)$$

Für die Funktion  $B(x, y)$  kann eine Kreisfunktion  $\text{circ}(\vec{x}/r)$  mit Radius  $r$  angenommen werden, was für  $\tilde{B}(k_x, k_y)$  auf eine Funktion  $\text{jinc}(k_r \cdot r)$  führt. Nimmt man der Einfachheit halber eine unendlich kleine Detektionsblende an und vernachlässigt die Stokes-Verschiebung, so ist  $\tilde{B}(k_x, k_y) \equiv \text{konst.}$  und für die Funktion  $\mathcal{K}(z)$  ergibt sich aus Gleichung (3.3) das Integral über das Betragsquadrat der in Abbildung 2.14 gezeigten Funktion näherungsweise:

$$\mathcal{K}_{\text{CLSM}}(z) \approx \iint dk_x dk_y |O_{\text{EPI.}}(k_x, k_y, z)|^2$$

Umgekehrt sieht man, dass eine breiter werdende Blende im Grenzwert einer unendlich großen Blende ( $\tilde{B}(f_x, f_y) = \delta(f_x, f_y)$ ) in Gleichung (3.2) wieder auf die Epifluoreszenz-OTF  $O_{\text{Epi}}(f_x, f_y, z)$  bzw. in Gleichung (3.3) auf eine konstante Funktion  $\mathcal{K}(z)$  führt.

Der Verlauf der Funktion  $\mathcal{K}(z)$  bestimmt, wie stark defokussierte Intensitätsanteile aus Ausserfokusebenen detektiert werden. Da die Funktion  $\mathcal{K}(z)$  somit die Konfokalität eines Mikroskops charakterisiert, wird diese Funktion im Folgenden als *Konfokalitätsfunktion* bezeichnet. Die Halbwertsbreite der Funktion  $\mathcal{K}(z)$  kann als Maß für die Konfokalität eines Systems betrachtet werden. Allerdings muss bei den gemessenen Werten von  $\mathcal{K}(z)$  auch immer der

konstante Versatz der Funktion relativ zur 0 (also das Signal, das auch bei beliebig großen Defokussierungen gemessen wird) berücksichtigt werden.

Die Konfokalitätsfunktion  $\mathcal{K}(z)$  für ein CLSM ist in Abbildung 3.6 gezeigt. Bei der Berechnung wurde eine kreisförmige Detektionsblendenfunktion  $B(x, y) = \text{circ}\left(\frac{\sqrt{x^2 + y^2}}{r}\right)$  mit dem Durchmesser einer beugungsbegrenzten PSF (volle Halbwertsbreite) angenommen. Deutlich kleinere Blendendurchmesser führen zu richtungs- bzw. genauer polarisationsabhängigen Artefakten im abgetasteten Bild.

Konfokale Verfahren erlauben es, dreidimensionale mikroskopische Aufnahmen zu erzeugen. Hierbei werden Bilder der Probe für mehrere verschiedene  $z$ -Positionen des Objektivs (bzw. der Probe) gespeichert. Die so gewonnenen Bilder werden als  $z$ -Stapel bezeichnet.

Eine Möglichkeit, die Konfokalitätsfunktion  $\mathcal{K}(z)$  zu messen ist z.B. einen  $z$ -Stapel der PSF des Mikroskops aufzunehmen. Das Integral über die PSF als Funktion der  $z$ -Position ergibt dann  $\mathcal{K}(z)$ . Die PSF eines Fluoreszenzmikroskops kann z.B. mit fluoreszierenden Perlen (engl. beads), deren Durchmesser deutlich unter der Auflösung des Mikroskops liegt gemessen werden.

Eine deutlich einfachere Methode  $\mathcal{K}(z)$  direkt zu messen besteht darin, einen  $z$ -Stapel durch eine möglichst dünne, möglichst gleichmäßig fluoreszierende Farbstoffschicht aufzunehmen. Der Abfall der Intensität der Farbstoffschicht ergibt dann eine von der Position  $(x, y)$  im Bildfeld abhängige Konfokalitätsfunktion  $\mathcal{K}(x, y, z)$ . Auf diese Weise lässt sich nicht nur die Konfokalität eines Systems, sondern auch die Gleichmäßigkeit der Konfokalität über das Bildfeld untersuchen. Durch sogenannte  $SIP^2$ -Charts [Bra04] (oder auch sog. *erweiterte SIP-Charts* (eSIP-Charts) [Wei08, But15]) lassen sich auf diese Weise konfokale Mikroskope charakterisieren und verschiedene Systeme miteinander vergleichen. Aufgrund der Tatsache, dass konfokale Bilder weitestgehend nur Information aus der beobachteten (d.h. fokussierten) Ebene enthalten, werden konfokale mikroskopische Bilder auch als *Schnittbilder* bzw. engl. *sections* bezeichnet [Con05].

## 3.2. Strukturierte Beleuchtung mit Liniengittern

Mikroskopie mit *strukturierter Beleuchtung* (kurz: SIM<sup>3</sup>) ist im Prinzip auch eine Art konfokaler Mikroskopie. Im Gegensatz zu den im vorigen Abschnitt genannten konfokalen Metho-

---

<sup>2</sup>von engl.: *Sectioned image property*

<sup>3</sup>von engl. *Structured Illumination Microscopy*

den bietet die strukturierte Beleuchtung [Hei06a]

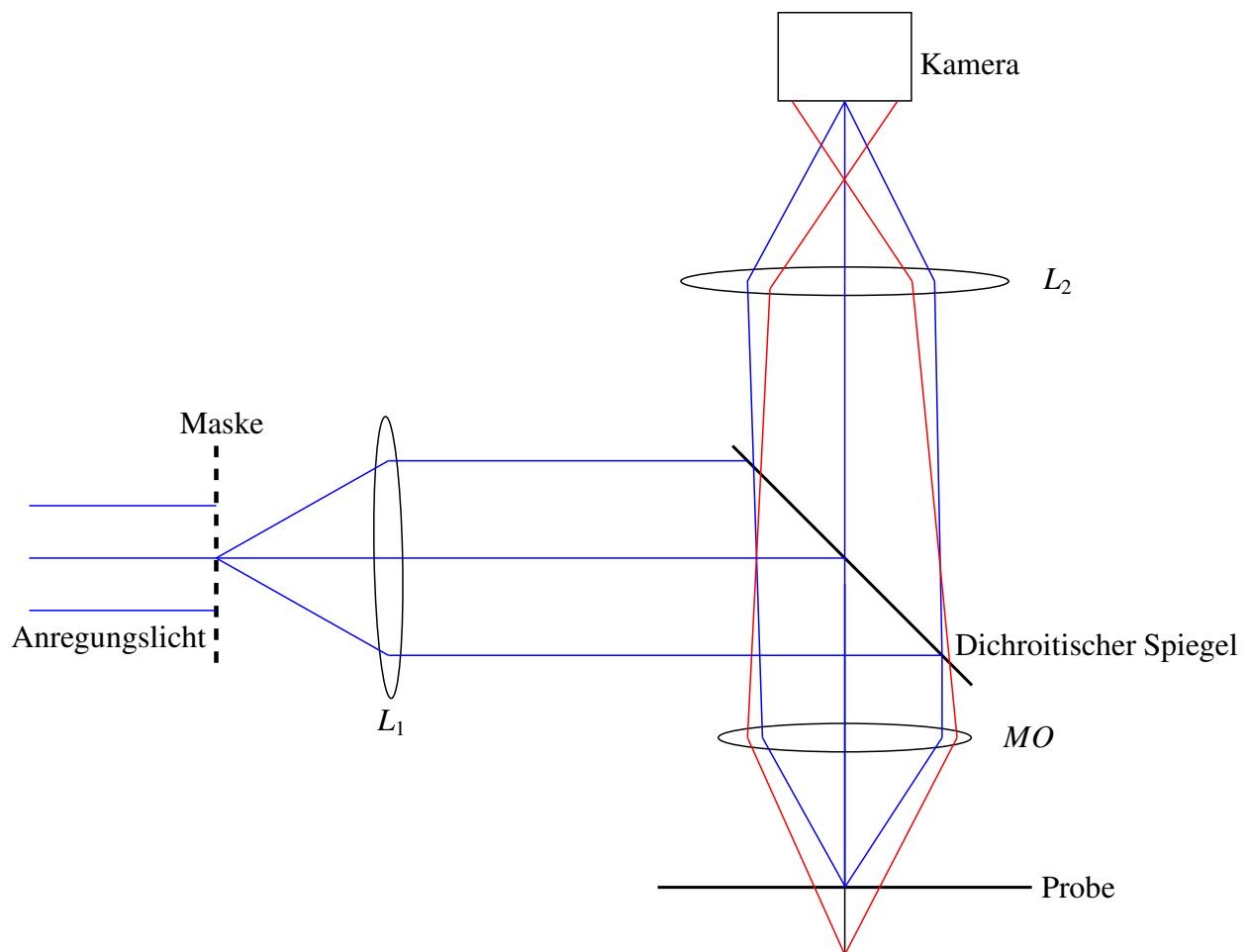
- bessere Lichteffizienz
- geringere Aufnahmezeit
- bessere Konfokalität
- bessere Auflösung.

Wie bei den Laserscanning-Verfahren wird bei der Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung eine Anregung in Form eines bestimmten Musters benutzt, welches meist das gesamte Objektfeld abdeckt. Dies kann beispielsweise auch ein Speckle Muster sein [Lim08, Ven07]. Üblicherweise wird allerdings ein periodisches Linienmuster für die Anregung benutzt. Die beiden wesentlichen Unterschiede zu den konfokalen Verfahren sind, dass

- eine Menge an Rohbildern aufgenommen und gespeichert werden muss, wobei jedes Rohbild der Menge einer bestimmten Position des Beleuchtungsmusters relativ zur Probe entspricht.
- keine Detektionsblende benutzt wird, d.h. die gesamte Emission mit dem Ausserfokus-signal wird detektiert. Stattdessen kann
  - eine rechnerische bzw. virtuelle Blendenfunktion verwendet werden, oder
  - wie weiter unten erläutert, die Modulation des Beleuchtungsmusters punktweise ausgewertet werden.

Da bei der SIM konfokale mikroskopische Bilder erzeugt werden können, obwohl sich im Strahlengang keine konfokale Detektionsblende befindet, wird die Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung auch als *quasikonfokal* [Hei06a] bezeichnet. Da mehrere Rohbilder für verschiedene Positionen des Beleuchtungsmusters gespeichert werden müssen, ist es notwendig das Bild des Musters in der Probe verschieben zu können. Aufgrund der Tatsache, dass jedes Rohbild einer bestimmten relativen Phasenlage des Beleuchtungsmusters entspricht, werden die Rohbilder auch als *Phasenbilder* bezeichnet.

Ein Nachteil der SIM ist, dass jegliche Bewegungen der Probe während der Aufnahme der benötigten Rohbilder vermieden werden müssen. Da das gesamte Bildfeld simultan detektiert wird, entstehen im Gegensatz zum CLSM auch dann Fehler im ausgewerteten Bild, wenn



**Abb. 3.5.:** Schema eines Mikroskops mit Strukturierter Beleuchtung. Die Beleuchtungsmaske wird auf die Probe abgebildet. Von der Kamera wird die gesamte Emission detektiert.

sich z.B. nur Teile der Probe innerhalb des Objektfelds bewegen. Des weiteren fallen bei der quasikonfokalen Mikroskopie deutlich höhere Datenmengen als bei den konfokalen Verfahren an. Allerdings erlauben die größeren Mengen an gemessener Information auch eine deutlich größere Flexibilität in der Auswertung. So kann z.B. bei der Verwendung virtueller Detektionsblenden der Blendendurchmesser je nach Bedarf nach der Bildaufnahme eingestellt werden. Da bei der SIM jeweils das gesamte Objektfeld simultan gemessen wird, lassen sich große Objektfelder deutlich schneller messen als mit den Scanning-Verfahren.

Ein schematischer Aufbau eines SIM Mikroskops ist in Abbildung 3.5 gezeigt: Eine Beleuchtungsmaske wird durch Anregungslicht beleuchtet und durch eine Linse  $L_1$  und das Mikroskopobjektiv  $MO$  auf die Fokusebene des Mikroskops abgebildet. Die fluoreszente Emission wird durch das Mikroskopobjektiv und die Linse  $L_2$  auf die Kamera abgebildet.



Wird das Muster in einer Richtung senkrecht zur optischen Achse (und den Gitterlinien) verschoben, so ändert sich auch die Lage des Musterbildes in der Probe. Um eine Bildauswertung zu ermöglichen, muss eine Menge an Bildern aufgenommen und gespeichert werden, wobei das Musterbild von einem bis zum jeweils darauf folgenden Rohbild um einen bestimmten räumlichen Versatz verschoben werden muss. Die Verschiebung des Musterbildes in der Probe kann natürlich auch z.B. durch bewegliche (galvanometrische) Spiegel im Strahlengang zwischen der Maske und dem Mikroskopobjektiv erreicht werden. Statt einer festen Beleuchtungsmaske kann z.B. auch ein Spatial-light-modulator (kurz. SLM) verwendet werden [Cha09, Hir09, Kř10]. Alternativ dazu kann das Beleuchtungsmuster z.B. auch interferometrisch [Bes11] erzeugt werden.

Grundsätzlich kann die Beleuchtungsmaske entweder inkohärent [Nei97] oder kohärent [Nei00] beleuchtet werden. Die inkohärente bzw. kohärente Abbildung periodischer Muster ist jeweils in Abschnitt 2.4.5 erläutert. Im inkohärenten Fall ist die OTF des Anregungsstrahlenganges entscheidend für die in der Probenebene erreichbare Mustermodulation der Intensität. Im kohärenten Fall muss die Beugung an der Maske und an der Pupille des Objektivs im Anregungsstrahlengang betrachtet werden.

Die Beleuchtungsmaske besteht üblicherweise aus einer Chromschicht auf Quarzglas und ist meist binär. D.h. für einen bestimmten Punkt  $(x, y)$  der Maske ist die Transmission der Maske entweder 0 oder 1. Das Verhältnis der transmittierenden Fläche zur gesamten Fläche der Maske wird als *Füllfaktor*  $F$  bezeichnet. Ein kleiner Füllfaktor ist bei der Auswertung mit virtuellen Blendenfunktionen aufgrund der größeren Abstände der Blenden vorteilhaft. Dadurch, dass alle Punkte des Objektfeldes durch die transmittierenden Bereiche des Musterbildes abgetastet werden müssen, nimmt die Anzahl der notwendigen Rohbilder bei größer werdender Musterperiode zu. Will man mit einer möglichst kleinen Zahl an notwendigen Rohbildern arbeiten, so ist es günstiger eine möglichst kleine Musterperiode zu wählen und die Modulation des Musterbildes in der Probe punktweise auszuwerten.

Die grundsätzliche Idee hierbei ist, den Infokus-Bereich des Mikroskopobjektives durch den Kontrast des Musters in der Probe zu markieren. Wie in Abschnitt 2.4.5 beschrieben, fällt der Kontrast eines periodischen Musterbildes bei einer bestimmten Defokussierung  $z$  ab. Bei inkohärenter Beleuchtung ergibt sich ein *jinc*-förmiger, bei kohärenter Beleuchtung ein kosinusförmiger Kontrastverlauf. Der genaue Verlauf des Kontrastes in  $z$ -Richtung hängt von

der Anregungswellenlänge, der numerischen Apertur (NA) des Mikroskopobjektives und von der Frequenz des verwendeten Beleuchtungsmusters ab. Sowohl bei inkohärenter als auch kohärenter Beleuchtung fällt der Kontrast der Grundfrequenz des Musters in  $z$ -Richtung am schnellsten ab, wenn man für die Gitterfrequenz  $\nu_g = 1$  wählt.

Da das ausgewertete Signal bei der SIM direkt von der Modulation des Musters in der Probe abhängt, hängt die Konfokalitätsfunktion hier vom Kontrastverlauf des Musters in  $z$ -Richtung ab. Die Konfokalitätsfunktion bei der SIM ist gegeben durch:

$$\mathcal{K}_{\text{SIM}}(z) = m_{(\text{exc.})}(z) \cdot O_{(\text{em.})}(\vec{k}_{\perp} = \vec{k}_g, z) \quad , \quad (3.4)$$

wobei  $m_{(\text{exc.})}(z)$  die Mustermodulation in der Probe als Funktion von  $z$  ist. Wie in Abschnitt 2.4.4 erläutert, ist der Verlauf der Funktion  $m_{(\text{exc.})}(z)$  bei inkohärenter Beleuchtung identisch mit dem Verlauf der OTF  $O_{\text{exc.}}(\vec{k}_{\perp} = \vec{k}_g, z)$  in  $z$ -Richtung. Zur Herleitung von (3.4) siehe Anhang B. Die Konfokalitätsfunktion für ein SIM-Mikroskop mit einer Beleuchtungsmaske der Frequenz  $\nu_g = 1$  ist in Abbildung 3.6 gezeigt. Für die Berechnung wurde ein Ölimmer-sionobjektiv mit einer NA von 1,45 angenommen ( $n_{\text{immersion}} = 1,518$ ). Man sieht, dass die Konfokalität bei der SIM deutlich besser ist als beim CLSM. Im Gegensatz zur Quantifizierung optischer Auflösung mit einer PSF, ist die Halbwertsbreite der Konfokalitätsfunktion  $\mathcal{K}$  nicht sehr aussagekräftig. Zur Quantifizierung des in einem Schnittbild enthaltenen Ausserfokussteils ist mehr das Integral über  $\mathcal{K}(z)$  entscheidend. Eine mögliche Quantifizierung des im Bild verbleibenden Ausserfokussignals ist z.B. die in [Wil11] definierte Funktion  $\eta(z)$ :

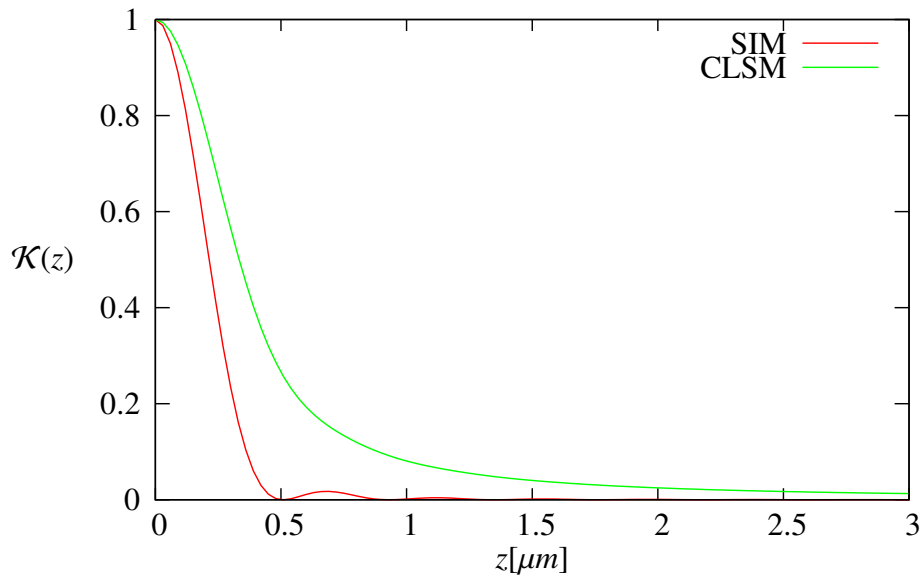
$$\eta(z) := \frac{\int_0^z \mathcal{K}(z') dz'}{\int_0^{\infty} \mathcal{K}(z) dz} \quad (3.5)$$

Der Vergleich der Größen  $\eta(z)$  für CLSM und SIM entsprechend dem Beispiel in Abbildung 3.6 ist in Abbildung B.1 gezeigt.

Im Folgenden wird für die quasikonfokale SIM eine inkohärente Beleuchtung und ein Liniengitter als SIM-Muster angenommen. Die Transmission  $T(x, y)$  eines Liniengitters, d.h. eines Gitters mit rechteckigem Transmissionsverlauf (siehe Abbildung 3.7) lässt sich folgendermaßen schreiben:

$$T(x, y) = \text{rect}\left(\frac{2x}{d}\right) * \text{comb}_p(x) \quad (3.6)$$

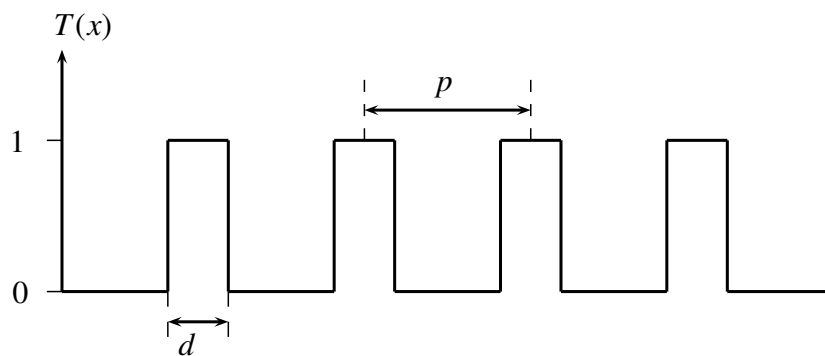
Der Füllfaktor dieses Musters ist gegeben durch  $F = \frac{d}{p}$ . O.B.d.A. liegt die Frequenzrichtung



**Abb. 3.6.:** Vergleich der Konfokalitätsfunktionen  $\mathcal{K}(z)$  eines Laserscanningmikroskops und eines SIM-Mikroskops. Für die Berechnung wurde ein 60x Ölimmersionsobjektiv mit NA 1.45 angenommen. Der Durchmesser der Detektionsblende beträgt eine volle Halbwertsbreite der beugungsbegrenzten (Emissions-)PSF des Mikroskops. Für die normalisierte Gitterfrequenz des SIM-Mikroskops wurde  $\nu_g = 1$  gewählt.

des Gitters in  $x$ -Richtung.

Wird das Muster inkohärent mit einer konstanten Intensität  $I_0$  beleuchtet, so ist die Intensität in der Ebene des Musters gegeben durch  $I_g(x, y) = I_0 \text{rect}\left(\frac{2x}{d}\right) * \text{comb}_p(x)$ . Aus dem Faltungs-



**Abb. 3.7.:** Transmission  $T(x)$  eines Rechtecksgitters.

theorem folgt für die Fouriertransformierte von  $I_g$ :

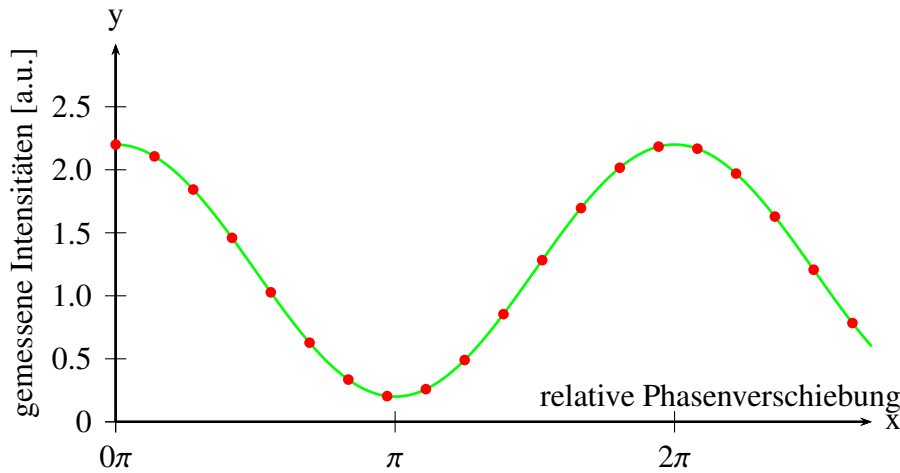
$$\begin{aligned}
 \tilde{I}_g(k_x, k_y) &= \frac{1}{(2\pi)^2} I_0 \underbrace{\frac{d}{p}}_F \operatorname{sinc}\left(k_x \frac{d}{2}\right) \cdot \operatorname{comb}_{\frac{2\pi}{p}}(k_x) = \\
 &= \frac{1}{(2\pi)^2} I_0 F \sum_{n=-\infty}^{\infty} \operatorname{sinc}\left(n \frac{2\pi d}{p} \frac{1}{2}\right) \delta\left(k_x - n \frac{2\pi}{p}\right) = \\
 &= \frac{1}{(2\pi)^2} I_0 F \sum_{n=-\infty}^{\infty} \operatorname{sinc}(n\pi F) \delta\left(k_x - n \frac{2\pi}{p}\right) \quad (3.7)
 \end{aligned}$$

Daraus folgt, dass die Fourierkoeffizienten des Musters durch den Füllfaktor bestimmt werden. Für einen Füllfaktor von  $F = \frac{1}{2}$  verschwinden z.B. alle geraden Fourierkoeffizienten. Gemäß Gleichung (2.37), erhält man die Fouriertransformierte der Anregungsintensität in der mikroskopischen Probe  $\tilde{I}^{(\text{exc.})}(k_x, k_y, z)$  durch das Produkt aus  $\tilde{I}_g(k_x, k_y)$  und der OTF  $O(k_x, k_y, z)$ . Wählt man für die Grundfrequenz  $|\vec{k}_g| = \frac{2\pi}{p} = \frac{2\pi}{\lambda} NA$ , d.h.  $\nu_g = 1$ , so werden alle (Raum-) Frequenzen durch die optische Transferfunktion  $O(k_x, k_y, z)$  gefiltert, bis auf die Nullfrequenz und die Grundfrequenz mit  $\nu = 1$ .

$$\begin{aligned}
 I^{(\text{exc.})}(k_x, k_y, z) &= \tilde{I}_g(k_x, k_y) \cdot \tilde{O}(k_x, k_y, z) = \\
 &= \frac{1}{(2\pi)^2} I_0 F \sum_{n=-1}^1 \operatorname{sinc}(n\pi F) O\left(n \frac{2\pi}{\lambda} NA, y, z\right) \delta\left(k_x - n \frac{2\pi}{\lambda} NA\right) \\
 \Rightarrow I^{(\text{exc.})}(x, y, z) &= I_0 F \left[ 1 + \underbrace{2 \operatorname{sinc}(\pi F) O\left(2\pi \frac{NA}{\lambda}, 0, z\right)}_{=: m_1(z)} \cos\left(2\pi \frac{NA}{\lambda} (x - x_0)\right) \right] = \\
 &= I_0 F \left[ 1 + m_1(z) \cos\left(\frac{2\pi}{p_g} x + \Phi_0\right) \right]
 \end{aligned}$$

Hierbei bezeichnet  $x_0$  die Lage des Maximums der Mustermodulation relativ zum gewählten Koordinatensystem und  $m_1$  die in der Probe erreichte Modulation der Grundfrequenz  $\frac{2\pi}{p_g}$ . Unter der Annahme eines linearen Ein-Photon-Fluoreszenz-Prozesses, ist die detektierte Emission proportional zum Produkt der kosinusförmigen Anregung mit der Fluorophordichte in der Probe.

Man nimmt an, dass mehrere Rohbilder aufgenommen werden, während das Gitter von einem zum darauf folgenden Rohbild um einen vorgegebenen Versatz  $\vec{\Delta}$  verschoben wird, wobei zunächst  $|\vec{\Delta}|$  deutlich kleiner sein soll als die Periode des Musters. Die sich so auf einem einzelnen Bildpunkt  $(x, y)$  ergebenden detektierten Intensitätswerte sind in Abbildung 3.8 als rote Punkte gegen die jeweilige relative Phasenverschiebung des Musterbildes im entsprechenden Rohbild aufgetragen. Der Mittelwert der gezeichneten Messwerte ist ein Maß für



**Abb. 3.8.:** Signalverlauf auf einem Pixel, abhängig von der aktuellen (Phasen-) Lage des Beleuchtungsgitterbildes. Die roten Punkte entsprechen 20 Werten für das Pixel  $(x, y)$  aus 20 genommenen Phasenbildern.

das nicht modulierte Ausserfokussignal. Genau genommen besteht dieser Anteil des Signals aus Ausserfokus- und Infokussignal und entspricht für alle Punkte  $(x, y)$  dem Epifluoreszenzbild. Die Amplitude des Kosinus ist ein Maß für das gesuchte quasikonfokale Infokussignal. Die absoluten Phasen der Kosinusfunktion hängen von der absoluten Lage des Gitterbildes relativ zum gewählten Koordinatensystem  $(x, y)$  ab.

Die Intensität auf einem Bildpunkt  $(x, y)$  im  $m$ -ten Phasenbild lässt sich also folgendermaßen schreiben:

$$I_m(x, y) = I^{(0)}(x, y) + I^{(1)}(x, y) \cos\left(\frac{2\pi}{p}x + \Phi_0 - \alpha_m\right) \quad (3.8)$$

Der Mittelwert der Werte  $I_m(x, y)$  über  $m$  ergibt wie bereits geschrieben das Epifluoreszenzsignal  $I^{(0)}$ . Die Amplitude der Kosinusfunktion  $I^{(1)}(x, y)$  ist das gesuchte Infokussignal und ergibt für alle Punkte  $(x, y)$  das quasikonfokale Bild des Objektes. Die relative Phasenverschiebung des Musters im  $m$ -ten Rohbild (d.h. die Phasenverschiebung relativ zum ersten Rohbild) ist gegeben durch  $\alpha_m$ , d.h.  $\alpha_1 = 0$ . Die absolute Phasenlage des Musters im ersten Rohbild  $\Phi_0(x, y)$ , ist in diesem Beispiel gegeben durch  $\Phi_0 = -\frac{2\pi}{p}x_0 = \Phi_0(x)$ , wobei  $x_0$  die Lage eines beliebigen Maximums von  $T(x, y)$  aus Gleichung (3.6) in der Bildebene des Mikroskops ist.

Eine einfache und auch nahe liegende Möglichkeit das Infokus-Signal zu ermitteln, ist z.B. eine gewisse Zahl  $N$  zueinander phasenverschobener Bildern aufzunehmen (angedeutet in Abbildung (3.8) mit  $N = 20$ ) und für jedes Pixel die Differenz aus Maximum und Minimum

aller gemessenen Werte zu bestimmen wie in Gleichung (3.9) [Hei06a, Hei06b]:

$$I^{(1)}(x, y) = \max_{m=1, \dots, N} I_m(x, y) - \min_{m=1, \dots, N} I_m(x, y) \quad (3.9)$$

Schreibt man die Kosinus-Funktion mit komplexen Exponentialfunktionen, so erhält man aus (3.8)

$$I_m(x, y) = I^{(0)}(x, y) + \frac{1}{2} I^{(1)}(x, y) e^{i \frac{2\pi}{p} x} e^{i \Phi_0} e^{-i \alpha_m} + \frac{1}{2} I^{(1)}(x, y) e^{-i \frac{2\pi}{p} x} e^{-i \Phi_0} e^{i \alpha_m} \quad (3.10)$$

Für mehrere Werte des Index  $m$  (bzw. für mehrere Phasenbilder) ergibt sich aus (3.10) für jeden Bildpunkt  $(x, y)$  ein lineares Gleichungssystem. Aufgrund der drei Unbekannten  $I^{(0)}$ ,  $I^{(1)}$  und  $\Phi_0$  benötigt man mindestens drei Phasenbilder um ein bestimmtes bzw. überbestimmtes Gleichungssystem zu erhalten.

Die Lösbarkeit hängt aber natürlich auch davon ab, welche Werte für die Phasenverschiebungen für  $\alpha_m$  gewählt werden. Gleichung (3.10) kann für die minimale Zahl von drei Rohbildern in Matrixschreibweise geschrieben werden:

$$\begin{pmatrix} I_1 \\ I_2 \\ I_3 \end{pmatrix} = \underbrace{\begin{pmatrix} 1 & e^{-i \alpha_1} & e^{i \alpha_1} \\ 1 & e^{-i \alpha_2} & e^{i \alpha_2} \\ 1 & e^{-i \alpha_3} & e^{i \alpha_3} \end{pmatrix}}_{=: \hat{A}} \begin{pmatrix} I^{(0)} \\ \frac{1}{2} I^{(1)} e^{i \frac{2\pi}{p} x} e^{i \Phi} \\ \frac{1}{2} I^{(1)} e^{-i \frac{2\pi}{p} x} e^{-i \Phi} \end{pmatrix} \quad (3.11)$$

Die Lösung des Gleichungssystems (3.10) reduziert sich so auf die Inversion der in Gleichung (3.11) definierten Matrix  $\hat{A}$ . Das Gleichungssystem ist lösbar, solange die Determinante von  $\hat{A}$  größer als null ist. Wie in Anhang A erläutert, bestimmt die Konditionszahl einer Matrix die Fehlerfortpflanzung der Messfehler bei der Auswertung. Wählt man in Gleichung (3.11) die Werte von  $\alpha_m$  gerade  $\alpha_m = (m-1) \frac{2\pi}{3}$ , so wird aus der Matrix  $\hat{A}$  die Fouriertransformationsmatrix  $\hat{W}$  (siehe Gleichung (A.7)). D.h. für diese Wahl der relativen Phasenverschiebungen, ist  $\hat{A}$  proportional zu einer unitären Matrix. Die Konditionszahl  $K$  nimmt daher für diese Wahl ihren minimal möglichen Wert von  $K = 1$  an.

$$\hat{A} = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & e^{-i \frac{2\pi}{3}} & e^{i \frac{2\pi}{3}} \\ 1 & e^{-i \frac{4\pi}{3}} & e^{i \frac{4\pi}{3}} \end{pmatrix} \quad (3.12)$$

Aufgrund dessen ist die Inverse von  $\hat{A}$  proportional zu ihrer adjungierten Matrix:

$$\hat{A}^{-1} = \frac{1}{3} \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & e^{i \frac{2\pi}{3}} & e^{i \frac{4\pi}{3}} \\ 1 & e^{-i \frac{2\pi}{3}} & e^{-i \frac{4\pi}{3}} \end{pmatrix}$$

Diese Lösung ist die diskrete Fouriertransformation des in Abbildung (3.8) gezeigten Signals für 3 Abtastpunkte. Man erhält die Lösung für das Infokussignal  $I^{(1)}$  aus Gleichung (3.11) aus der zweiten bzw. dritten Zeile der Matrix  $\hat{A}^{-1}$  [Nei97]

$$I^{(1)} = \frac{2}{3} |I_1 + I_2 e^{i\frac{2\pi}{3}} + I_3 e^{i\frac{4\pi}{3}}| = \frac{\sqrt{2}}{3} \sqrt{(I_1 - I_2)^2 + (I_2 - I_3)^2 + (I_3 - I_1)^2} \quad (3.13)$$

getrennt vom Ausserfokussignal

$$I^{(0)} = \frac{1}{3} (I_1 + I_2 + I_3) \quad . \quad (3.14)$$

Zur Herleitung von Gleichung (3.13), siehe z.B. Anhang D.1.

### 3.3. Auflösungssteigerung durch Strukturierte Beleuchtung

Eine weitere Möglichkeit, die sich durch die Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung bietet ist, dass die laterale Auflösung über die durch das Rayleigh Kriterium für eine beugungsbegrenzte Optik (siehe Gleichung (2.12)) festgelegte Grenze hinaus gesteigert werden kann. Anschaulich basiert diese Möglichkeit der Auflösungssteigerung auf dem so genannten *Moiré-Effekt*<sup>4</sup>. Hauptsächlich sind die beim Moiré-Effekt auftretenden Muster als *Alias-Effekte* (oder engl. *aliasing*) bekannt und treten normalerweise bei falsch abgetasteten periodischen Signalen auf. Der Effekt folgt daher aus dem Abtasttheorem von Whittaker, Kotelnikow und Shannon [Nyq28, Kot33]. Die Verfahren, welche die strukturierte Beleuchtung zur räumlichen Auflösungssteigerung verwenden, werden im Folgenden mit *SR-SIM*<sup>5</sup> abgekürzt.

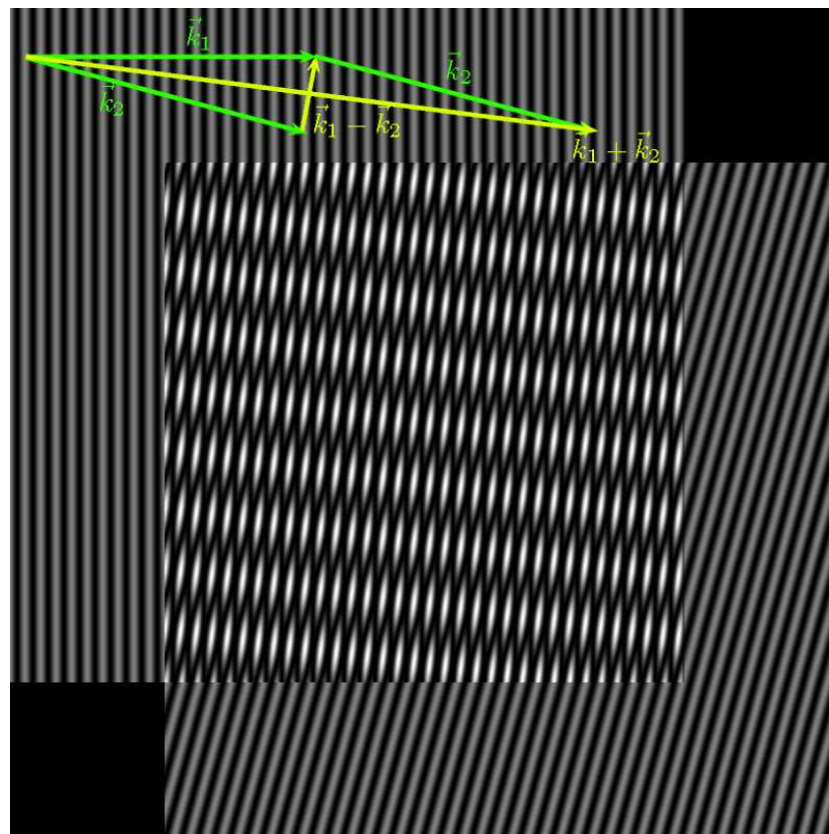
#### 3.3.1. Auflösungssteigerung in zwei Dimensionen

Der Moiré-Effekt tritt allgemein bei der Überlagerung zweier (oder auch mehrerer) periodischer Muster auf. In Abbildung (3.9) ist ein Beispiel für den Moiré-Effekt gezeigt: Die Überlagerung des Linienmusters links oben und des Linienmusters rechts unten lässt im Überla-

---

<sup>4</sup>frz. zu engl. mohair, nach dem Glanz der Mohärwolle [Bro03]

<sup>5</sup>engl. *Superresolution SIM*



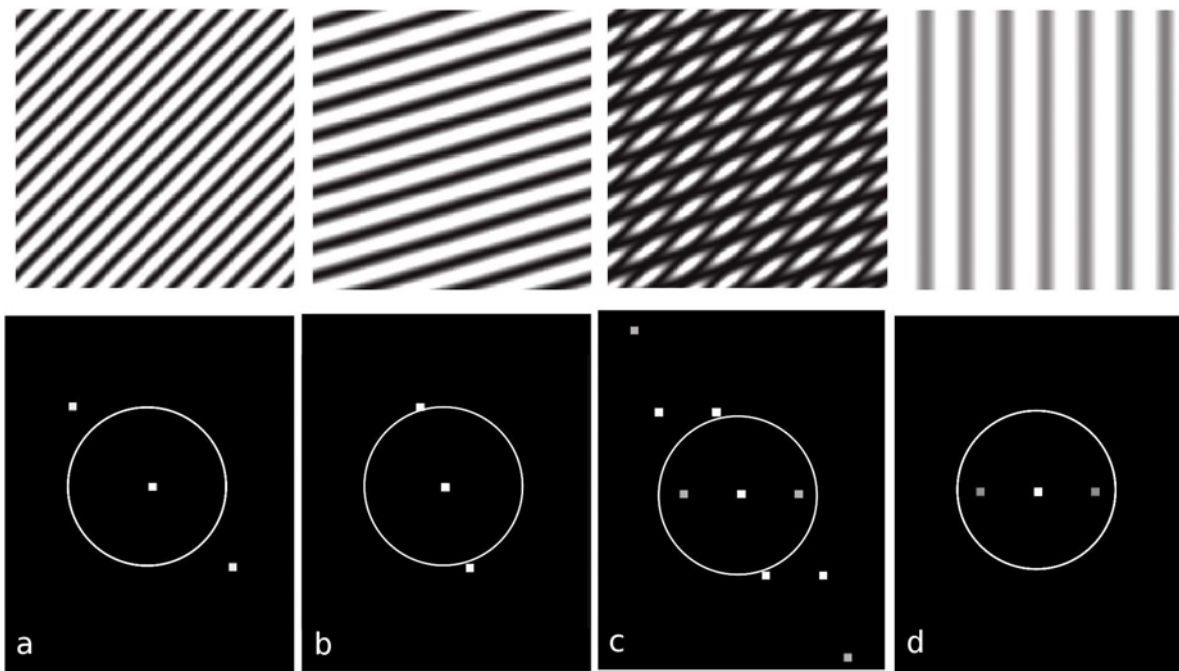
**Abb. 3.9.:** Moiré-Effekt durch Überlagerung (Produkt) zweier Linienmuster. Das so entstehende Muster enthält die Summe und die Differenz der überlagerten Frequenzen.

gerungsbereich ein neues Muster entstehen. Die Multiplikation der beiden Musterintensitätswerte entspricht nach dem Faltungstheorem im Fourierraum einer Faltung der beiden Muster. Aufgrund dessen enthält das im Überlappungsbereich entstandene Muster sowohl die Summe als auch die Differenz der beiden überlagerten Musterfrequenzen.

Die erste Veröffentlichung zur Auflösungssteigerung durch strukturierte Beleuchtung von Lukosz und Marchand [Luk63] aus dem Jahr 1963 stellt ein Verfahren vor, mit dem die mikroskopische Auflösung für ein Objekt, das nur eine einzige Frequenz enthält (also ein Liniengitter) gesteigert werden kann. Wie in Abschnitt 2.4.2 erläutert, kann die (inkohärente) Abbildung in einem Mikroskop im Fourierraum durch die Multiplikation mit der optischen Transferfunktion  $O(k_x, k_y, k_z)$  beschrieben werden. Der Träger der OTF bestimmt die größte Raumfrequenz, die das optische System noch passieren kann. Das Prinzip der Auflösungssteigerung durch den Moiré-Effekt ist in Abbildung 3.10 veranschaulicht [Hei06a]: Das Muster in (a) liegt jenseits der durch die OTF definierten Auflösungsgrenze. Dennoch können mit strukturierter Beleuchtung (b) Frequenzanteile des Objekts (a) die optische Transferfunktion passieren (c). Die Frequenz des in (d) gemessenen Musters stimmt aber nicht mit der Objekt-



frequenz überein, sondern entspricht der Differenz der Objektfrequenz (a) und der Frequenz des Anregungsmusters (b); d.h. das gesuchte Signal in (a) wurde um die Frequenz des modulierten Anregungslichtes im Frequenzraum verschoben. Um eine korrekte Rekonstruktion der Objektintensität zu erhalten, muss daher die detektierte Frequenz in (d) um die bekannte Anregungsfrequenz (b) an ihren ursprünglichen Ort im Frequenzraum (a) zurück verschoben werden.



**Abb. 3.10.:** Auflösungssteigerung durch den Moiré-Effekt (aus [Hei06a]). Die Bilder der zweiten Zeile zeigen die Fouriertransformierten der entsprechenden Bilder der ersten Zeile. Mit einem Mikroskop können nur Frequenzen innerhalb des Trägers der OTF (angedeutet durch den weißen Kreis) gemessen bzw. beobachtet werden. Bei der Messung des Objekts in (a) gilt das nur für die Nullfrequenz, d.h. es würde im mikroskopischen Bild eine konstante Intensität gemessen. Wird das Objekt im Mikroskop mit einem periodisch modulierten Intensitätsmuster (b) beleuchtet, entsteht durch die Überlagerung der Objekt- und Musterfrequenzen ein Moiré (c). Das Moiré enthält die Summen und Differenzen aller überlagerter Frequenzanteile. (d): Ein Teil der Frequenzen des Moirés in (c) kann die OTF passieren, nämlich die Frequenzen die sich durch die Differenz der Objektfrequenz (a) und der Musterfrequenz (b) ergeben. Durch Verschiebung der detektierten Frequenzen (d) um die Musterfrequenz (b) lässt sich daher das Objekt (a) rekonstruieren. Aufgrund der Stokes-Verschiebung ist der Durchmesser der Pupillenfunktion des Anregungsstrahlenganges etwas größer als der des Emissionsstrahlenganges. Daher können die Frequenzen der Anregung in (b), sogar etwas außerhalb des eingezeichneten Trägers der Emissions-OTF liegen.

Üblicherweise wird ein mikroskopisches Objekt nicht periodisch sein und daher sehr viele verschiedene Raumfrequenzen enthalten. Erste Konzepte zur Auflösungssteigerung mit SIM für allgemeine, nicht periodische Objekte wurden z.B. in [Hei99], [Gus00b] oder [Gus00a] vorgestellt. In [Hei99] wurde mit inkohärenten Lichtquellen und Beugungsgittern (bzw. Transmissionsgittern) gearbeitet. In [Gus00a] wurden Phasenmuster mit Laserlicht beleuchtet und alle Ordnungen bis auf die  $\pm 1$ . Beugungsordnung ausgeblendet. In Fall von zwei in der Objektebene des Mikroskops interferierende Beugungsordnungen, kann man wie im Abschnitt 3.2 die Anregungsintensität  $I_m^{\text{exc.}}(x, y)$  im  $m$ -ten Phasenbild folgendermaßen schreiben:

$$\begin{aligned} I_m^{\text{exc.}}(\vec{x}) &= I_0(1 + m_1 \cos(\vec{k}_g \vec{x} + \Phi_0 - \alpha_m)) = \\ &= I_0 \Re \left( 1 + m_1 e^{i\vec{k}_g \vec{x}} e^{i\Phi_0} e^{-i\alpha_m} \right) \end{aligned}$$

$I_0$  bezeichnet die mittlere Anregungsintensität,  $m_1$  die in der Probe erreichte Mustermodulation,  $\vec{k}_g = \frac{2\pi}{p} [\cos(\theta), \sin(\theta)]^t$  die Musterfrequenz (in Richtung  $\theta$  relativ zur  $x$ -Achse) und  $\Phi_0$  die absolute Phasenlage des Musters im ersten Phasenbild. Die relative Phasenverschiebung zum ersten Phasenbild ist wieder  $\alpha_m$ . Die Musterfrequenz wird gerade so gewählt, dass die  $\pm 1$ . Beugungsordnungen des Musters die Objektivpupille an ihrem Rand passieren, d.h.  $\nu_g = 1$ . Die Fouriertransformierte der Intensität bzw. das Raumfrequenzspektrum der Intensität lautet daher:

$$\tilde{I}_m^{\text{exc.}}(\vec{k}) = \frac{1}{(2\pi)^2} I_0 \left( \delta(\vec{k}) + \frac{m_1}{2} e^{i\Phi_0} e^{-i\alpha_m} \delta(\vec{k} - \vec{k}_g) + \frac{m_1}{2} e^{-i\Phi_0} e^{i\alpha_m} \delta(\vec{k} + \vec{k}_g) \right) \quad (3.15)$$

Bei einem linearen Fluoreszenz-Prozess führt das beim  $m$ -ten Phasenbild auf die Emissionsintensität  $I_m^{\text{em.}}$

$$I_m^{\text{em.}}(\vec{x}) = I^{\text{exc.}}(\vec{x}) \cdot S(\vec{x}) = S(\vec{x}) I_0 \Re \left( 1 + m_1 e^{i\vec{k}_g \vec{x}} e^{i\Phi_0} e^{-i\alpha_m} \right),$$

wenn  $S(\vec{x})$  die Objektfunktion, bzw. genauer die Fluorophordichte in der Probe ist. Aus dem Faltungstheorem folgt daraus für die Fouriertransformierte der Intensität der Emission:

$$\begin{aligned} \tilde{I}_m^{\text{em.}}(\vec{k}) &= \tilde{I}_m^{\text{exc.}}(\vec{k}) * \tilde{S}(\vec{k}) = \\ &\propto \left( \tilde{S}(\vec{k}) + \frac{m_1}{2} e^{i\Phi_0} e^{-i\alpha_m} \tilde{S}(\vec{k} - \vec{k}_g) + \frac{m_1}{2} e^{-i\Phi_0} e^{i\alpha_m} \tilde{S}(\vec{k} + \vec{k}_g) \right) \end{aligned} \quad (3.16)$$

Im Raumfrequenzspektrum der emittierten Intensität  $\tilde{I}_m^{\text{em.}}(\vec{k})$  sind hier drei frequenzverschobene Kopien des Raumfrequenzspektrums des Objektes  $\tilde{S}(\vec{k})$  enthalten. Die drei frequenzverschobenen Kopien des Objektfrequenzspektrums werden auch als Frequenzbänder bezeichnet. Die Fouriertransformierte der detektierten Intensität im  $m$ -ten Phasenbild  $\tilde{I}_m^{\text{det.}}(k_x, k_y)$  ergibt sich aus der Multiplikation von  $\tilde{I}_m^{\text{em.}}(\vec{k})$  mit der OTF  $O(k_x, k_y)$ :

$$\tilde{I}_m^{\text{det.}}(\vec{k}) = O(\vec{k}) \cdot \left( \tilde{S}(\vec{k}) + \frac{m_1}{2} e^{i\Phi_0} e^{-i\alpha_m} \tilde{S}(\vec{k} - \vec{k}_g) + \frac{m_1}{2} e^{-i\Phi_0} e^{i\alpha_m} \tilde{S}(\vec{k} + \vec{k}_g) \right) \quad (3.17)$$

Für jede Frequenz  $\vec{k} = (k_x, k_y)^t \in \text{supp}(O(\vec{k}))$  enthält die Fouriertransformierte eines gemessenen Phasenbildes die Überlagerung der Werte von drei verschiedenen Frequenzbändern. Für mehrere Phasenbilder  $\tilde{I}_m^{\text{det}}(\vec{k})$  ist (3.17) ein lineares Gleichungssystem. Aufgrund der drei Unbekannten sind mindestens drei Phasenbilder  $\tilde{I}_m^{\text{det}}(\vec{k})$  notwendig um das Gleichungssystem zu lösen. Wählt man für die Phasenverschiebungen  $\alpha_m = (m - 1)\frac{2\pi}{3}$ , mit  $m \in \{1, 2, 3\}$ , so lautet das Gleichungssystem (3.17):

$$\begin{pmatrix} \tilde{I}_1^{\text{det}}(\vec{k}) \\ \tilde{I}_2^{\text{det}}(\vec{k}) \\ \tilde{I}_3^{\text{det}}(\vec{k}) \end{pmatrix} = O(\vec{k}) \underbrace{\begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & e^{-i\frac{2\pi}{3}} & e^{i\frac{2\pi}{3}} \\ 1 & e^{-i\frac{4\pi}{3}} & e^{i\frac{4\pi}{3}} \end{pmatrix}}_{\hat{A}} \cdot \begin{pmatrix} \tilde{S}(\vec{k}) \\ \frac{m_1}{2} e^{i\Phi_0} \tilde{S}(\vec{k} - \vec{k}_g) \\ \frac{m_1}{2} e^{-i\Phi_0} \tilde{S}(\vec{k} + \vec{k}_g) \end{pmatrix} \quad (3.18)$$

Die Matrix  $\hat{A}$  in Gleichung (3.18) stimmt mit der Matrix  $\hat{A}$  in Gleichung (3.11) und (3.12) überein, denn die Gleichung (3.18) entspricht der zeilenweisen Fouriertransformierten der Gleichung (3.11).

Die Lösung der Frequenzbänder in Gleichung (3.18) ergibt sich analog zu Gleichung (3.11) aus der Inversion der Matrix  $\hat{A}$ . Aufgrund der Linearität der Fouriertransformation, können die Frequenzbänder auch im Ortsraum getrennt werden. D.h. wie in Gleichung (3.11) wird  $\hat{A}^{-1}$  mit dem Vektor  $(I_1^{\text{det}}(\vec{x}), I_2^{\text{det}}(\vec{x}), I_3^{\text{det}}(\vec{x}))^t$  multipliziert und erst dann Fourier-transformiert.

Das weitere Konzept der Auswertung zu einem Bild mit gesteigerter Auflösung ist in Abbildung 3.11 gezeigt: Zunächst werden die Frequenzbänder  $\tilde{D}^{(1)}(\vec{k}) := O(\vec{k})\tilde{S}(\vec{k} - \vec{k}_g)$  und  $\tilde{D}^{(-1)}(\vec{k}) := O(\vec{k})\tilde{S}(\vec{k} + \vec{k}_g)$  (erste Zeile Mitte und rechts) an ihre ursprüngliche Position im Frequenzraum zurückverschoben. Das führt auf die detektierten Frequenzbänder

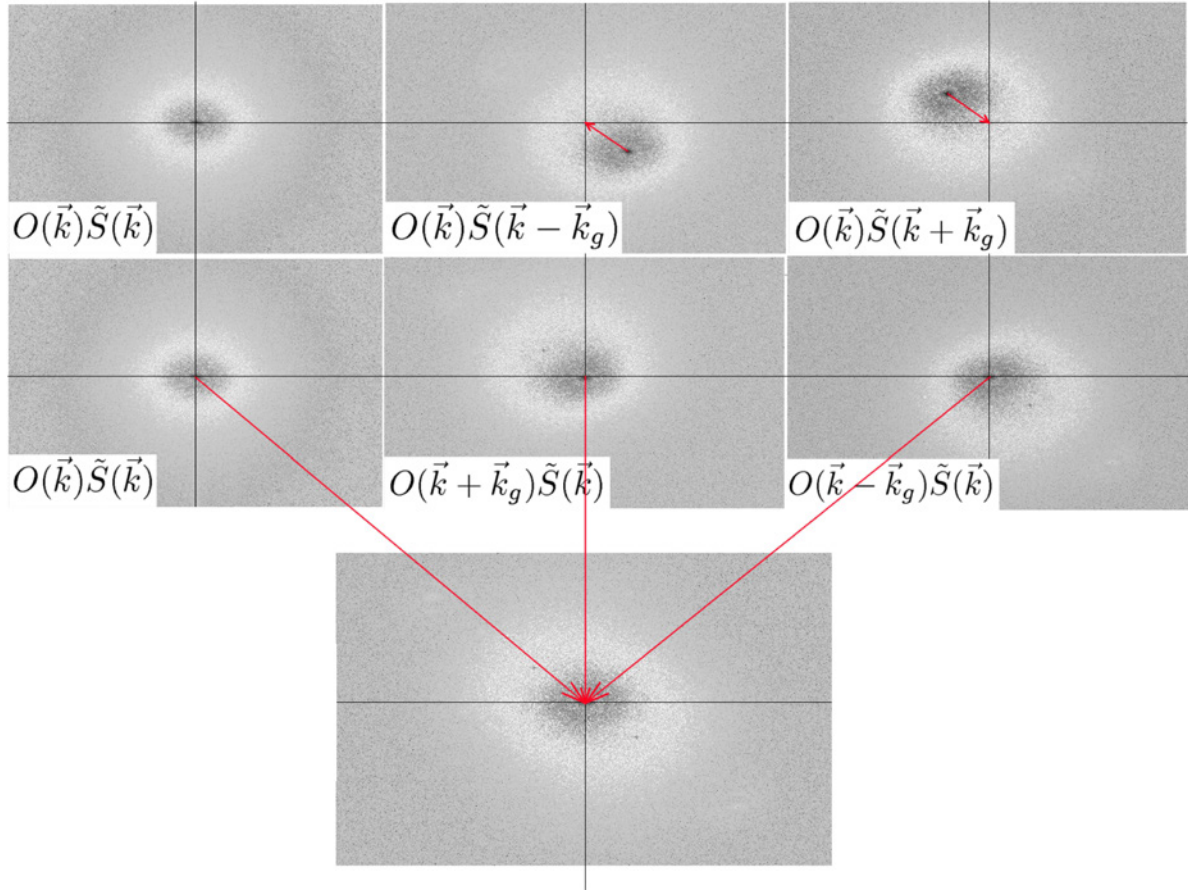
$$\tilde{D}^{(0)}(\vec{k}) := O(\vec{k})\tilde{S}(\vec{k}) \quad (3.19)$$

$$\begin{aligned} \frac{m_1}{2} e^{i\Phi_0} \tilde{D}^{(1)}(\vec{k} + \vec{k}_g) &:= \frac{m_1}{2} e^{i\Phi_0} O(\vec{k} + \vec{k}_g) \tilde{S}(\vec{k}) \\ \frac{m_1}{2} e^{-i\Phi_0} \tilde{D}^{(-1)}(\vec{k} - \vec{k}_g) &:= \frac{m_1}{2} e^{-i\Phi_0} O(\vec{k} - \vec{k}_g) \tilde{S}(\vec{k}) \end{aligned} \quad (3.20)$$

deren Absolutbeträge in der zweiten Zeile von Abbildung 3.11 gezeigt sind.

Es seien

$$\begin{aligned} \tilde{E}^{(1)}(\vec{k}) &:= \tilde{D}^{(1)}(\vec{k} + \vec{k}_g) \cdot O(\vec{k}) \quad \text{und} \\ \tilde{E}^{(0)}(\vec{k}) &:= \tilde{D}^{(0)}(\vec{k}) \cdot O(\vec{k} + \vec{k}_g) \end{aligned}$$



**Abb. 3.11.:** Schematische Darstellung der Rekonstruktion eines Bildes mit gesteigerter Auflösung: 1. Zeile: Die Absolutbeträge der einzelnen Lösungen aus Gleichung (3.18). Die Nullfrequenz ist immer in der Mitte des jeweiligen Bildes. 2. Zeile: Die Frequenzbänder werden an ihre ursprüngliche Position im Frequenzraum zurückverschoben. 3. Zeile: Die Überlagerung der Frequenzbänder ergibt die Fouriertransformierte eines Bildes mit gesteigerter Auflösung.

Der Frequenzvektor  $\vec{k}_g$  kann dann beispielsweise durch Finden des Maximums der Funktion

$$C(\vec{k}) := \left| \sum_{\vec{k}'} (\tilde{E}^{(0)}(\vec{k}'))^* \tilde{E}^{(1)}(\vec{k}' + \vec{k}) \right|$$

(z.B. mittels Gradientensuchverfahren) bestimmt werden [Lal16]. Danach können die Vorfaktoren der Frequenzbänder ( $z_{\pm 1} = \frac{m_1}{2} e^{\pm i\Phi_0}$ ) durch eine komplexe lineare Regression ermittelt werden, da z.B.  $\tilde{E}^{(0)}(\vec{k})$  und  $\tilde{E}^{(1)}(\vec{k})$  bis auf den komplexen Faktor  $z_1 = \frac{m_1}{2} e^{i\Phi_0}$  übereinstimmen (vergleiche (3.19) mit (3.20)). Man beachte hierbei, dass der Fehler des ermittelten Frequenzvektors dementsprechend auch in den Fehler der komplexen Vorfaktoren  $z_{\pm 1} = \frac{m_1}{2} e^{\pm i\Phi_0}$  mit eingeht.

Anschließend wird jedes Band mit  $2/m_1 e^{\mp i\Phi_0}$  multipliziert und die Frequenzbänder werden (gewichtet) aufsummiert (vgl. Abschnitt 3.3.2). Die Rücktransformation der überlagerten Bänder in den Ortsraum ergibt dann ein Bild mit gesteigerter mikroskopischer Auflösung.

In dem bisher beschriebenen Verfahren wurde bisher nur die Auflösung in einer Richtung der  $(x, y)$ -Ebene verbessert, nämlich in Richtung der Gitterfrequenz  $\vec{k}_g$ . Um eine möglichst richtungsunabhängige Auflösungssteigerung zu erreichen, müssen Phasenbilder unter mehreren Orientierungen des Linienmusters aufgenommen werden. Üblicherweise werden drei Orientierungen des Musters gewählt ( $0^\circ$ ,  $120^\circ$  und  $240^\circ$ ) [Gus00a]. In den hier beschriebenen Verfahren müssen also insgesamt  $3 \times 3 = 9$  Phasenbilder für die Auswertung aufgenommen werden. Da für jede Orientierung  $d \in \{1, 2, 3\}$  drei Frequenzbänder  $\tilde{D}^{(n)}$  ( $n \in \{-1, 0, 1\}$ ) existieren, werden diese im Folgenden mit  $\tilde{D}_d^{(n)}$  abgekürzt. Die selbe Abkürzung wird für den Frequenzvektor  $\vec{k}_g^d$  verwendet.

Bei der Auswertung sind einige Dinge zu beachten:

- Die Gitterfrequenz  $\vec{k}_g^d$  um die die Frequenzbänder verschoben werden müssen, wird in der Regel nicht ganzzahlig sein, da die Gitterperiode in der Kameraebene meist gerade kein ganzzahliges Vielfaches der Pixelgröße ist. Die Verschiebung des  $\pm 1$ . Frequenzbandes  $\tilde{D}_d^{(\pm 1)}(\vec{k})$  erfolgt daher idealerweise nicht im Frequenzraum, sondern im Ortsraum durch Multiplikation des Bildes mit der Funktion  $e^{\pm i\vec{k}_g^d \cdot \vec{x}}$ .
- Obwohl die Periode des verwendeten Linienmusters während der Messung invariant ist, ändern sich während der Messung (und von einer Messung zur nächsten) die Orientierungen des Frequenzvektors  $\vec{k}_g^d$ . Aufgrund dessen muss der exakte Gitterfrequenzvektor  $\vec{k}_g^d$  für jede Orientierung bei jeder Messung neu bestimmt werden. Hierfür wird üblicherweise zunächst das detektierte Band  $\tilde{D}_d^{(1)}(\vec{k} + \vec{k}_g^d)$  mit der unverschobenen OTF  $O(\vec{k})$  und das detektierte Band  $\tilde{D}_d^{(0)}(\vec{k})$  mit der verschobenen OTF  $O(\vec{k} + \vec{k}_g^d)$  multipliziert. Für die Verschiebung der Bänder in diesem ersten Schritt, werden theoretische Werte für  $\vec{k}_g^d$  (entsprechend den theoretischen Orientierungen des Liniengitters) benutzt. Beide Größen sollten (abgesehen von Messfehlern bzw. Rauschen) für alle Frequenzen  $\vec{k}$  für die die Bänder überlappen, dieselben Werte liefern, nämlich  $O(\vec{k} + \vec{k}_g^d)O(\vec{k})\tilde{S}(\vec{k})$ . Die Kreuzkorrelation beider Größen ergibt dann einen noch wenig genauen Wert für die Gitterfrequenz  $\vec{k}_g^d$ . Durch Interpolation des lokalen Maximums der Kreuzkorrelation und anschließender Optimierung mit Sub-Pixel Verschiebungen im Frequenzraum

(siehe [Gus00a] bzw. oben) kann der Frequenzvektor subpixelgenau direkt aus den Phasenbildern ermittelt werden. Dieser Schritt ist der kritischste Schritt der Auswertung, da Fehler der Gitterfrequenz zu periodischen Artefakten und ausserdem zu Fehlern in den für die Auswertung benötigten Phasen  $\Phi_0^d$  führen.

- Die Mustermodulation  $m_1^d$  sowie die benötigten Phasen des Linienmusters im jeweils ersten Rohbild  $\Phi_0^d$  müssen ebenso für jede Orientierung  $d$  bestimmt werden. Hierfür kann z.B. eine komplexe lineare Regression von  $\tilde{D}_d^{(1)}(\vec{k} + \vec{k}_g)O(\vec{k})$  gegen  $\tilde{D}_d^{(0)}(\vec{k})O(\vec{k} + \vec{k}_g)$  in dem Bereich in dem die Bänder  $\tilde{D}_d^{(1)}(\vec{k} + \vec{k}_g)$  und  $\tilde{D}_d^{(0)}(\vec{k})$  überlappen, verwendet werden.
- Aufgrund der Tatsache, dass bei der SR-SIM Auswertung die optische Transferfunktion des Mikroskops benötigt wird, muss diese im Vorfeld gemessen werden. Hierbei kann die PSF z.B. mit Hilfe fluoreszierender Perlen (mit Durchmesser deutlich unterhalb der durch Rayleigh definierten Auflösungsgrenze) direkt gemessen werden. Idealerweise werden zur Bestimmung der PSF die Bilder mehrerer solcher Perlen gemittelt. Die Fouriertransformation der PSF ergibt dann die OTF.

#### 3.3.2. Überlagerung der Frequenzbänder

Im Prinzip könnten die Frequenzbänder  $\tilde{D}_d^{(n)}$  einfach in Form einer gewichteten Summe aufsummiert werden [Hei99, Cra00, So01, Som08]:

$$\tilde{S}^{(\text{lin})}(\vec{k}) := \sum_{d=1}^3 \sum_{n=-1}^1 s_d^{(n)} \tilde{D}_d^{(n)}(\vec{k} + n\vec{k}_g^d) \quad (3.21)$$

Die jeweiligen Gewichte der Bänder  $s_n^d$  können im Prinzip beliebig gewählt werden. Setzt man für das Objekt  $S(\vec{x})$  eine Punktlichtquelle

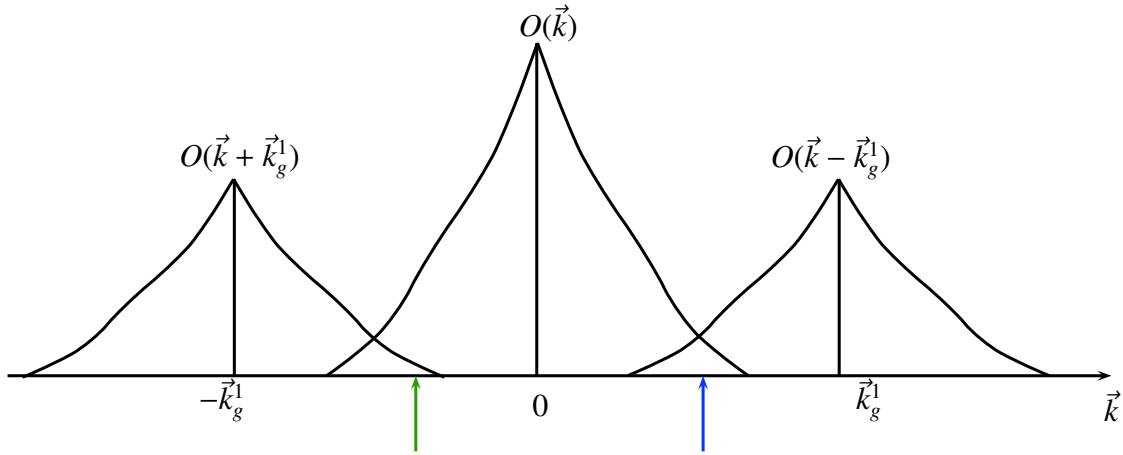
$$S(\vec{x}) \propto \delta(\vec{x}) \Rightarrow \tilde{S}(\vec{k}) \propto \text{const.}$$

in Gleichung (3.21) ein, so erhält man die effektive OTF der linearen Überlagerung  $O_{\text{SR-SIM}}^{(\text{lin})}(\vec{k})$

$$\begin{aligned} O_{\text{SR-SIM}}^{(\text{lin})}(\vec{k}) &= \sum_{d=1}^3 \sum_{n=-1}^1 s_d^{(n)} O(\vec{k} + n\vec{k}_g^d) = \\ &= O(\vec{k}) * \sum_{d=1}^3 \sum_{n=-1}^1 s_d^{(n)} \delta(\vec{k} + n\vec{k}_g^d) \quad , \end{aligned} \quad (3.22)$$

wobei  $O(\vec{k})$  in Gleichung (3.22) so skaliert wird, dass  $O_{\text{SR-SIM}}^{(\text{lin})}(\vec{k} = 0) = 1$  gilt, d.h.  $s_0^d = 1/3 \forall d \in \{1, 2, 3\}$ . Die Rücktransformation von Gleichung (3.22) in den Ortsraum ergibt dann die effektive auflösungsgesteigerte PSF bei linearer Überlagerung der Bänder:

$$h_{\text{SR-SIM}}^{(\text{lin})}(\vec{x}) = h(\vec{x}) \cdot \left( 1 + \sum_{d=1}^3 2s_1^d \cos(\vec{k}_g^d \vec{x}) \right)$$



**Abb. 3.12.:** Effektive OTF der Rekonstruktion bei linearer gewichteter Überlagerung der Frequenzbänder  $\tilde{D}_1^{(n)}$  für eine Orientierung  $d = 1$ .

Aufgrund der Tatsache, dass jedes Band  $\tilde{D}_d^{(n)}(\vec{k} + n\vec{k}_g^d)$  das mit der jeweiligen OTF  $O(\vec{k} + n\vec{k}_g^d)$  gefilterten Objektspektrum  $\tilde{S}(\vec{k})$  enthält, ist die Signalstärke eines Bandes nicht für alle Frequenzen gleich groß. In Abbildung 3.12 ist die lineare gewichtete Überlagerung der Frequenzbänder zur effektiven OTF  $O_{\text{SR-SIM}}^{(\text{lin})}$  illustriert: Für manche Frequenzen werden im Überlappbereich zweier (oder allgemein mehrerer) Bänder die Anteile der überlagerten Bänder in der Summe in Gleichung (3.22) etwa gleich groß (blauer Pfeil), für andere Frequenzen trägt ein Band deutlich mehr zum Signal in der Summe bei als das andere (grüner Pfeil).

Für eine optimale Überlagerung der Bänder sollte daher die in den Bändern  $\tilde{D}_d^{(n)}(\vec{k} + n\vec{k}_g^d)$  enthaltenen OTFs  $O(\vec{k} + n\vec{k}_g^d)$  kompensiert werden [Shr08, Gus00a, Rig13, Hei03]. Das übliche Vorgehen bei der optimalen Überlagerung der Bänder ist im Folgenden beschrieben:

Vor dem Aufsummieren der Frequenzbänder  $\tilde{D}_d^{(n)}(\vec{k} + n\vec{k}_g^d)$  wird jedes Band mit der komplex

konjugierten der dem Band entsprechend frequenzverschobenen OTF multipliziert, also

$$\sum_{d=1}^3 \sum_{n=-1}^1 O^*(\vec{k} + n\vec{k}_g^d) \tilde{D}_d^{(n)}(\vec{k} + n\vec{k}_g^d) .$$

Anschließend wird das Ergebnis durch die Summe der Absolutbetragsquadrate aller verschobener OTFs und einer Konstante  $\epsilon \in \mathbb{R}$  geteilt. Insgesamt ergibt das [Gus00a] [Gus08]:

$$\tilde{S}(\vec{k}) = \frac{\sum_{d=1}^3 \sum_{n=-1}^1 O^*(\vec{k} + n\vec{k}_g^d) \tilde{D}_d^{(n)}(\vec{k} + n\vec{k}_g^d)}{\sum_{d=1}^3 \sum_{n=-1}^1 |O(\vec{k} + n\vec{k}_g^d)|^2 + \epsilon^2} \quad (3.23)$$

Die Überlagerung der Bänder in Gleichung (3.23) entspricht einem verallgemeinerten Wiener Filter, d.h. für jede Frequenz  $\vec{k}$  für die zwei oder mehr Bänder überlappen, wird eine gewichtete Summe der Anteile der Bänder berechnet. Die Gewichte entsprechen der (jeweiligen OTF  $O(\vec{k} + n\vec{k}_g^d)$  entsprechenden) Signalstärke der Bänder  $\tilde{D}_d^{(n)}(\vec{k} + n\vec{k}_g^d)$ .

Setzt man  $\epsilon = 0$  und wählt als Objekt einen einzelnen Lichtpunkt  $S(\vec{x}) \propto \delta(\vec{x}) \Rightarrow \tilde{S}(\vec{k}) \propto \text{const.}$ , so erhält man für  $\tilde{S}(\vec{k})$  in Gleichung (3.23) die OTF der SR-SIM mit gesteigerter Auflösung. Man sieht (vgl. Abbildung 3.10), dass der Durchmesser des Trägers der neuen OTF  $O_{\text{SR-SIM}}(\vec{k})$  doppelt so groß ist, wie der Durchmesser des Trägers der ursprünglichen OTF  $O(\vec{k})$  des Mikroskops. Innerhalb des Trägers der SR-SIM OTF, erhält man für alle Werte von  $\tilde{S}(\vec{k})$  in Gleichung (3.23) eine Konstante, d.h. die OTF gleicht in diesem Fall einer Kreisfunktion. Aufgrund dessen wird die PSF in diesem Fall auch negative Intensitätswerte aufweisen. Um negative Intensitätswerte in der Auswertung auszuschließen, wird die gewichtete Summe in Gleichung (3.23) zusätzlich noch mit einer *Ziel-OTF* bzw. einer Apodisierungsfunktion  $O_{\text{Ziel}}(\vec{k})$  multipliziert:

$$\tilde{S}(\vec{k}) = O_{\text{Ziel}}(\vec{k}) \frac{\sum_{d=1}^3 \sum_{n=-1}^1 O^*(\vec{k} + n\vec{k}_g^d) \tilde{D}_d^{(n)}(\vec{k} + n\vec{k}_g^d)}{\sum_{d=1}^3 \sum_{n=-1}^1 |O(\vec{k} + n\vec{k}_g^d)|^2 + \epsilon^2} \quad (3.24)$$

Die inverse Fouriertransformation von Gleichung (3.24) ergibt dann das ausgewertete Bild mit gesteigerter Auflösung. Die Überlagerung der Frequenzbänder in Gleichung (3.24) kann auch durch die Minimierung eines Funktional  $\mathcal{L}^{(\text{opt})}$  hergeleitet werden. Siehe hierzu z.B. Anhang G. Im Fall von Proben, bei denen auch Ausserfokuslicht detektiert wurde, ist die Überlagerung gemäß Gleichung (3.24) nicht optimal, da die Funktionen  $O^*(\vec{k})$  im Zähler von (3.24) gerade diejenigen Frequenzen am stärksten gewichtet, für die aufgrund des missing-cone (vgl. Abschnitt 2.4.7) am meisten Ausserfokussignal detektiert wurde. In diesem Fall können diese Bereiche der OTFs, wie z.B. in [Wic13] beschrieben, durch eine Gauß-Funktion abgeschwächt werden um das Ausserfokussignal im ausgewerteten Bild zu reduzieren.



### 3.3.3. Auflösungssteigerung in drei Dimensionen

Das bisher in den Abschnitten 3.3.1 und 3.3.2 beschriebene Verfahren kann auf drei Dimensionen erweitert werden. Hierbei werden für eine Reihe von  $z$ -Positionen des Objektivs jeweils eine Mindestzahl  $N$  an Phasenbildern aufgenommen.

Hierbei wird für die Erzeugung der strukturierten Anregungsintensität in der Probe üblicherweise ein Phasenmuster mit kohärenter Beleuchtung benutzt [Gus00a]. Das Phasenmuster muss gerade derart beschaffen sein, dass die nullte Beugungsordnung etwa 80% der Intensität der ersten Beugungsordnungen erreicht. Wird die Periode bzw. Grundfrequenz des Phasenmusters gerade so gewählt, dass die ersten Beugungsordnungen im Anregungsstrahlengang die Pupille des Mikroskopobjektivs am Rande passieren ( $\nu_g = 1$ ), führt das aufgrund der größeren Reflexionsverluste der Randstrahlen im Objektiv dazu, dass die Wellen der nullten und der ersten Beugungsordnungen mit der (in etwa) gleichen Amplitude in der Objektebene des Mikroskops interferieren. Wie in Abschnitt 2.4.5 erläutert und in Abbildung 3.13 illustriert, führt das zu einer Amplitude wie in Gleichung (2.44). Die Anregungsintensität im  $m$ -ten Phasenbild ist dementsprechend durch Gleichung (2.45) gegeben:

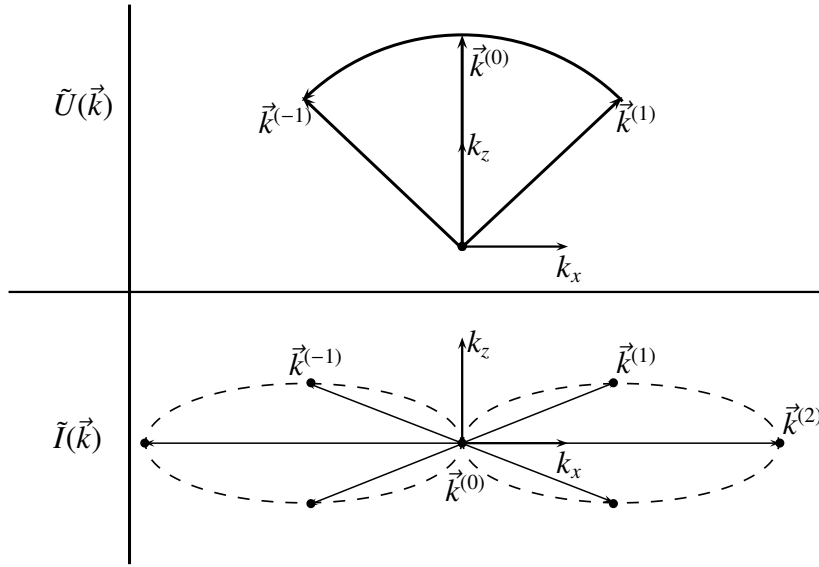
$$\begin{aligned} I_m^{\text{exc.}}(x, y, z) &= I_0(1 + m_1 \cos\left(\frac{\lambda}{4\pi n} k_g^2 z\right) \cos(k_g x + \Phi_0^{(1)} - \alpha_m^{(1)}) + m_2 \cos(2k_g x + \Phi_0^{(2)} - \alpha_m^{(2)}) \\ &= I_0 \Re \left( 1 + m_1 \cos\left(\frac{\lambda}{4\pi n} k_g^2 z\right) e^{ik_g x} e^{i\Phi_0^{(1)}} e^{-i\alpha_m^{(1)}} + m_2 e^{i2k_g x} e^{i\Phi_0^{(2)}} e^{-i\alpha_m^{(2)}} \right) \end{aligned} \quad (3.25)$$

Hierbei bezeichnet  $I_0$  die mittlere Intensität der Anregung in der Probe,  $m_1$  die Modulation der Grundfrequenz bzw. Frequenz 1. Ordnung, und  $m_2$  die Modulation der doppelten Grundfrequenz bzw. Frequenz 2. Ordnung.

Wie in Abschnitt 2.3 erläutert, ist der Ausdruck  $\frac{\lambda}{4\pi n} k_g^2 z$  in Gleichung (3.25) nur für kleine Aperturen/Beugungswinkel gültig. Für große Aperturen muss der entsprechende Defokusterm in Gleichung (3.25) wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben angepasst werden. Man sieht, dass sich die Anregungsintensität, wie auch in [Gus00a] folgendermaßen schreiben lässt:

$$I_m^{\text{exc.}}(x, y, z) = \sum_{n=-2}^2 I_{\parallel, n}^{\text{exc.}}(z) \cdot I_{\perp, m, n}^{\text{exc.}}(x, y) \quad (3.26)$$

Hierbei ist  $n$  der Index der lateralen Frequenzordnung der Anregungsintensität. Jede Frequenzordnung  $n$  hat einen lateralen (von  $(x, y)$  abhängigen) Anteil  $I_{\parallel, n}^{\text{exc.}}(x, y)$  und einen axialen (von  $z$  abhängigen) Anteil  $I_{\parallel, n}^{\text{exc.}}(z)$ . Ein Vergleich mit Gleichung (2.45) zeigt, dass nur die Grundfrequenzen mit  $n = \pm 1$  von  $z$  abhängen und dass diese Ordnungen (unter der Annahme totaler



**Abb. 3.13.:** Illustration der in der Anregungsintensität enthaltenen Frequenzordnungen. Oben: Die 0., 1. und −1. Beugungsordnung der Amplitude  $\tilde{U}(\vec{k})$  können die Apertur (bzw. die Pupille) des Anregungsstrahlenganges (bzw. des Mikroskopobjektivs) passieren und interferieren in der Objektebene des Mikroskops. Die Fouriertransformierte  $\tilde{I}(\vec{k})$  entspricht der Autokorrelation der Amplitude  $\tilde{U}(\vec{k})$  und enthält daher alle Möglichen Differenzfrequenzen von  $\tilde{U}(\vec{k})$ .

Kohärenz) in  $z$ -Richtung einen kosinusförmigen Verlauf haben:

$$I_{\parallel,n}^{\text{exc.}}(z) = \begin{cases} \cos(k_z^{(n)} z) & \text{falls } \vec{k}^{(n)} \text{ Grundfrequenz} \\ 1 & \text{sonst.} \end{cases} \quad (3.27)$$

Wie in Abschnitt 3.3 führt das unter der Annahme eines linearen Fluoreszenz-Prozesses auf die Intensität der Emission:

$$\begin{aligned} I_m^{\text{em.}}(\vec{x}) &= I_m^{\text{exc.}}(\vec{x}) \cdot S(\vec{x}) = \\ &= S(\vec{x}) I_0 \Re \left( 1 + m_1 \cos \left( \underbrace{\frac{\lambda}{4\pi n}}_{k_z^{(1)}} k_g^2 z \right) e^{ik_g x} e^{i\Phi_0^{(1)}} e^{-i\alpha_m^{(1)}} + m_2 e^{i2k_g x} e^{i\Phi_0^{(2)}} e^{-i\alpha_m^{(2)}} \right) \end{aligned}$$

Die detektierte Intensität im  $m$ -ten Phasenbild  $I_m^{\text{det.}}$  in der Ebene der Kamera kann aus der Faltung der emittierten Intensität mit der PSF des Emissionsstrahlenganges berechnet werden:

$$\begin{aligned} I_m^{\text{det.}}(x, y, z) &= (h^{\text{em.}} * I_m^{\text{em.}})(\vec{x}) = [h^{\text{em.}} * (S \cdot I_m^{\text{exc.}})](\vec{x}) = \\ &= \iiint d^3 x' h^{\text{em.}}(\vec{x} - \vec{x}') S(\vec{x}') I_m^{\text{exc.}}(\vec{x}') \end{aligned} \quad (3.28)$$

Setzt man Gleichung (3.26) in Gleichung (3.28) ein, so erhält man

$$I_m^{\text{det.}}(x, y, z) = \sum_{n=-2}^2 \iiint d^3 x' h^{\text{em.}}(\vec{x} - \vec{x}') S(\vec{x}') I_{\parallel, n}^{\text{exc.}}(z') I_{\perp, m, n}^{\text{exc.}}(x', y') \quad (3.29)$$

In Gleichung (3.29) entspricht  $\vec{x}'$  dem Koordinatensystem des mikroskopischen Objekts und  $\vec{x}$  dem Koordinatensystem in der Bild- bzw. Kameraebene. Das Koordinatensystem  $(\vec{x} - \vec{x}')$  ist das Koordinatensystem des Mikroskopobjektivs. Für  $z \neq 0$  beschreibt Gleichung (3.29) die Intensitätsverteilung in einer Ebene vor (bzw. hinter) der eigentlichen Bildebene bei  $z = 0$ .

Bei der Aufnahme eines Bildstapels, wird aber in der Regel nicht die Kamera in  $z$ -Richtung verschoben, sondern das Mikroskopobjektiv. Da die Erzeugung des SIM-Musters in der Probe  $I^{\text{exc.}}(x', y', z')$  aber durch das selbe Objektiv erfolgt, befindet sich das Muster relativ zum Objektivkoordinatensystem immer in der selben Ebene. Daher muss zur Beschreibung der detektierten Intensität in einem Bildstapel,  $I_{\parallel, n}^{\text{exc.}}(z')$  in Gleichung (3.29) durch  $I_{\parallel, n}^{\text{exc.}}(z - z')$  ersetzt werden:

$$I_m^{\text{det.}}(x, y, z) = \sum_{n=-2}^2 \iiint d^3 x' \underbrace{h^{\text{em.}}(\vec{x} - \vec{x}') \cdot I_{\parallel, n}^{\text{exc.}}(z - z')}_{=: h_n^{\text{em.}}(\vec{x} - \vec{x}')} S(\vec{x}') I_{\perp, m, n}^{\text{exc.}}(x', y') \quad (3.30)$$

$$= \sum_{n=-2}^2 \underbrace{[h_n^{\text{em.}} * S I_{\perp, m, n}^{\text{exc.}}](\vec{x})}_{=: I_n^{\text{det.}}(\vec{x})} \quad (3.31)$$

Durch diese Koordinatentransformation in  $z$ -Richtung enthält die detektierte Intensität in Gleichung (3.30) nicht mehr die Faltung des axialen Anregungsprofils  $I_{\parallel, n}^{\text{exc.}}(z)$  mit der Emissions-PSF  $h^{\text{em.}}(x, y, z)$  sondern das Produkt der beiden Größen. Daher lässt sich für jede Frequenzordnung  $n$  eine Emissions-PSF  $h_n^{\text{em.}}(\vec{x})$  definieren. Dementsprechend ist die OTF der  $n$ -ten Frequenzordnung gegeben durch die Faltung der Emissions-OTF des Mikroskop-Objektivs mit dem axialen Anregungsprofil der  $n$ -ten Frequenzordnung:

$$O_n(\vec{k}) = O(\vec{k}) * \tilde{I}_{\parallel, n}^{\text{exc.}}(k_z) \quad (3.32)$$

Die Fouriertransformierte des axialen Anregungsprofils  $\tilde{I}_{\parallel, n}^{\text{exc.}}$  ist im Fall eines Liniengitters gemäß Gleichung (3.27) gegeben durch:

$$\tilde{I}_{\parallel, n}^{\text{exc.}}(k_z) \propto \begin{cases} \frac{1}{2}(\delta(k_z - k_z^{(n)}) + \delta(k_z + k_z^{(n)})) & \text{falls } \vec{k}^{(n)} \text{ Grundfrequenz} \\ \delta(k_z) & \text{sonst.} \end{cases}$$

Die Definition der OTF in Gleichung (3.32) ist daher nur für die Grundfrequenz(en) des Anregungsmusters relevant.

Wie in Abschnitt 3.3 kann die detektierte Intensität im  $m$ -ten Rohbild für jede Orientierung  $d$  auch in der dreidimensionalen SR-SIM als Überlagerung mehrerer Frequenzbänder  $\tilde{I}_{m,n}^{\text{det.}}(\vec{k})$  geschrieben werden. Aus Gleichung (3.31) folgt für die Fourier-Transformierte der detektierten Intensität:

$$\tilde{I}_m^{\text{det.}}(\vec{k}) = \sum_{n=-2}^2 \tilde{I}_{m,n}^{\text{det.}}(\vec{k}) = \sum_{n=-2}^2 \frac{m_n}{2} \underbrace{e^{i\Phi_0^{(n)}} e^{-i\alpha_m^{(n)}}}_{e^{in\Phi_0^{(1)}}} \underbrace{O_n(\vec{k}) \tilde{S}(\vec{k} - n\vec{k}_g^{(d)})}_{=: \tilde{D}^{(n)}(\vec{k})} \quad (3.33)$$

Wie im zweidimensionalen Fall (Gleichung (3.17) in Abschnitt 3.3) ergibt Gleichung (3.33) für mehrere verschiedene Phasenlagen  $\alpha_m^{(n)}$  des Musters ein lineares Gleichungssystem für jede Frequenz  $\vec{k}^{(n)} \in \text{supp}(O_n(\vec{k}))$ . Aufgrund der fünf unbekannten  $\tilde{D}_0(\vec{k})$ ,  $\tilde{D}_1(\vec{k})$ ,  $\tilde{D}_2(\vec{k})$ ,  $\tilde{D}_{-1}(\vec{k})$  und  $\tilde{D}_{-2}(\vec{k})$  sind für jede Orientierung mindestens fünf Phasenbilder zur Lösung des Gleichungssystems notwendig. Genau genommen ergeben sich  $\tilde{D}^{(-1)}(\vec{k})$  und  $\tilde{D}^{(-2)}(\vec{k})$  durch komplexe Konjugation von  $\tilde{D}^{(1)}(\vec{k})$  und  $\tilde{D}^{(2)}(\vec{k})$  und sind somit keine Unbekannten. Tatsächlich ist die Zahl der unbekannten Größen aufgrund der unbekannten Phasenlagen  $\Phi_0^{(1)}$  und  $\Phi_0^{(2)}$  dennoch gleich fünf. Bei dicken Proben kann die absolute Phasenlage der Frequenzen  $\Phi_0^{(n)}$  auch von der Position  $z$  der Fokusebene in der Probe abhängen.

Wie in Abschnitt 3.3 müssen bei der dreidimensionalen SR-SIM bei Verwendung eines Liniengitters Phasenbilder mit mindestens drei Orientierungen des Linienmusters gespeichert werden um letztlich im auflösungsgesteigerten Bild eine möglichst richtungsunabhängige PSF zu erhalten. Das bedeutet, dass bei dem in diesem Abschnitt beschriebenen Verfahren insgesamt mindestens 15 Phasenbilder für eine Auswertung gespeichert werden müssen.

Nach der Trennung der überlagerten Frequenzbänder  $\tilde{D}_d^{(n)}(\vec{k})$  entspricht die weitere Auswertung zu einem Volumen mit gesteigerter Auswertung dem in Abschnitt 3.3 erläuterten Vorgehen: Die Frequenzbänder werden wieder an ihre ursprüngliche Position im Frequenzraum verschoben und in Form einer gewichteten Summe wie in Gleichung (3.23) zu dem gesuchten Frequenzspektrum überlagert. Die inverse Fourier-Transformation dieses Raumfrequenzspektrums ergibt dann ein Volumenbild (bzw. einen Bildstapel) mit gesteigerter Auflösung in  $x$ -,  $y$ - und  $z$ -Richtung. Typischerweise wird durch das Verfahren (wenn man für die Gitterfrequenz  $\nu_g = 1$  wählt) eine Auflösungssteigerung um einen Faktor 2 in allen drei Raumrichtungen erzielt.

Das in diesem und den vorangegangenen Abschnitten beschriebene Konzept der Auflösungssteigerung durch SIM, lässt sich auch auf nichtlineare Fluoreszenzprozesse erweitern (siehe

z.B. [Hei02, Gus05, LW16]). Aufgrund der Nichtlinearität lassen sich hier Modulationen mit noch höheren Frequenzen in der Anregungsintensität erreichen. Das führt zu einer gesteigerten Zahl an überlagerten Frequenzbändern in einem Rohbild und dadurch eine theoretisch (d.h. bei Vernachlässigung jeglicher Messfehler bzw. beliebig großem Signal-Rausch-Verhältnis) beliebigen Auflösungssteigerung ermöglicht.



## 4. Strukturierte Beleuchtung mit zweidimensionalen Mustern

Wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, werden auch in der SR-SIM meist eindimensionale Gittermuster verwendet [Del, Haa07, Gus00a, Gus08]. Um in der in Abschnitt 3.3 erläuterten Auswertung zu einem höher-aufgelöstem Bild eine in  $(x, y)$  homogene Auflösungssteigerung zu erhalten, müssen Phasenbilder in 3 Orientierungen ( $0^\circ$ ,  $120^\circ$ ,  $240^\circ$ ) des Liniengitters zur späteren Auswertung aufgenommen werden.

Die Drehung des Linienmusters führt in der Auswertung dazu, dass die Frequenz des Musters für jede Orientierung neu bestimmt werden muss (siehe hierzu Abschnitt 3.3.1). Bei dem in Abschnitt 3.3.3 gezeigten Verfahren zur Auflösungssteigerung in drei Dimensionen, werden Phasenbilder für mehrere Fokuspositionen  $z$  des Objektivs gemessen. Aufgrund der Auswertung mit dreidimensionalen Frequenzbändern, sollten die Frequenzvektoren für alle gemessenen  $z$ -Positionen gleich bleiben. Aufgrund dessen müssen insgesamt drei  $z$ -Stapel mit drei verschiedenen Orientierungen des Liniengitters aufgenommen werden, wobei für jede Ebene  $z$ , mindestens  $N = 5$  Phasenbilder gespeichert werden müssen. Hierbei wirken sich Fehler in den  $z$ -Positionen, die gerade bei dicken Proben bzw. Bildstapeln mit vielen Ebenen auftreten können, entsprechend auf die Auswertung aus.

Die Verwendung zweidimensionaler insbesondere hexagonaler Muster macht die Drehung des Musters für die SR-SIM überflüssig. Daher erübrigt sich die Bestimmung der Musterfrequenzvektoren in jeder Messung und es macht kompaktere Bauweisen für SR-SIM Mikroskope möglich. Im Prinzip kann jedes quasikonfokale Mikroskop mit zweidimensionalen Mustern auch zur Auflösungssteigerung benutzt werden.

Bei der quasikonfokalen strukturierten Beleuchtung kann man zeigen, dass SIM mit Liniengittern eine stark richtungsabhängigen MTF ergibt. Die Verwendung von zweidimensionalen

#### 4. Strukturierte Beleuchtung mit zweidimensionalen Mustern

Mustern ergibt auch in der Messung eine deutlich weniger richtungsabhängige MTF. Siehe hierzu Abschnitt 4.2.2 bzw. [Sch14].

Würde man in Gleichung (3.8) in Abschnitt 3.2 ein Liniengitter mit einer größeren Periode verwenden, so würde das dazu führen, dass in der Intensität  $I_m(x, y)$  mehr als nur eine modulierte Frequenz enthalten ist, d.h:

$$\begin{aligned} I_m(\vec{x}_\perp) &= \sum_{n=0}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} I^{(n)}(\vec{x}) \cos(\vec{k}_n \vec{x} - \alpha_m^{(n)} - \Phi_0^{(n)}) = \\ &= I^{(0)}(\vec{x}) + \frac{1}{2} \sum_{n=1}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} I^{(n)}(\vec{x}) e^{i\vec{k}^{(n)} \vec{x}} e^{i\Phi_0^{(n)}(\vec{x})} e^{-i\alpha_m^{(n)}} + \frac{1}{2} \sum_{n=1}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} I^{(n)}(\vec{x}) e^{-i\vec{k}^{(n)} \vec{x}} e^{-i\Phi_0^{(n)}(\vec{x})} \underbrace{e^{i\alpha_m^{(n)}}}_{e^{-i\alpha_m^{(-n)}}} \end{aligned} \quad (4.1)$$

Das Signal im Punkt  $\vec{x}_\perp = (x, y)$  ist also durch eine Überlagerung von insgesamt  $N$  Frequenz-Ordnungen gegeben. Es gilt  $\Phi_0^{(n)} := -\vec{k}^{(n)} \cdot \vec{x}_0$  und  $\alpha_m^{(n)}$  ist die Phasenverschiebung der  $n$ -ten Frequenzordnung im  $m$ -ten Phasenbild. Gleichung (4.1) lässt sich in Matrixschreibweise darstellen:

$$\underbrace{\begin{pmatrix} I_1(\vec{x}) \\ I_2(\vec{x}) \\ I_3(\vec{x}) \\ \vdots \\ \vdots \\ I_M(\vec{x}) \end{pmatrix}}_{\text{gemessene Werte}} = \hat{A} \cdot \underbrace{\begin{pmatrix} I^{(0)}(\vec{x}) \\ \frac{1}{2} I^{(1)}(\vec{x}) e^{i\vec{k}^{(1)} \vec{x}} e^{i\Phi_0^{(1)}} \\ \frac{1}{2} I^{(-1)}(\vec{x}) e^{-i\vec{k}^{(1)} \vec{x}} e^{-i\Phi_0^{(1)}} \\ \frac{1}{2} I^{(2)}(\vec{x}) e^{i\vec{k}^{(2)} \vec{x}} e^{i\Phi_0^{(2)}} \\ \vdots \\ \frac{1}{2} I^{(-\lfloor \frac{N}{2} \rfloor)}(\vec{x}) e^{-i\vec{k}^{(-\lfloor \frac{N}{2} \rfloor)} \vec{x}} e^{-i\Phi_0^{(-\lfloor \frac{N}{2} \rfloor)}} \end{pmatrix}}_{\text{gesuchte Frequenzbänder}} \quad (4.2)$$

$M$  bezeichnet die Anzahl der aufgenommenen Phasenbilder. Der Vektor auf der rechten Seite von (4.2) hat  $N$  Einträge. Daher ist  $\hat{A}$  eine  $M \times N$  Matrix. Damit  $\hat{A}$  invertierbar ist, muss  $M \geq N$  gelten und  $\det(\hat{A}) \neq 0$ . Die Einträge von  $\hat{A}$  kann man aus (4.1) ablesen. Sie sind gegeben durch

$$\hat{A}_{m,n} = e^{-i\alpha_m^{(n)}} \quad (4.3)$$

Die Frequenz-Ordnungen  $n$  werden im weiteren in der Reihenfolge  $0, 1, -1, 2, -2, \dots, \lfloor \frac{N}{2} \rfloor, -\lfloor \frac{N}{2} \rfloor$  indiziert.

Nimmt man an, dass von einem zum nächsten Phasenbild immer die gleiche laterale Verschiebung  $\vec{\Delta}$  erfolgt, und dass das erste Phasenbild ( $m = 1$ ) gar nicht verschoben ist ( $\alpha_1^{(n)} = 0$ ), so kann man die Phasenverschiebungen  $\alpha_m^{(n)}$  folgendermaßen schreiben:

$$\alpha_m^{(n)} = (m - 1) \vec{k}^{(n)} \cdot \vec{\Delta} \quad (4.4)$$



Für den speziellen Fall eines Gitters (o.B.d.A. in x-Richtung), ist  $\vec{k}^{(n)} = n \frac{2\pi}{p} \hat{e}_x$  und

$$\alpha_m^{(n)} = (m-1) \cdot n \cdot \Delta \frac{2\pi}{p} \cdot \cos(\theta) \quad ,$$

wobei  $\theta$  den Winkel zwischen dem Verschiebevektor  $\Delta$  und der  $x$ -Achse bezeichnet und  $\Delta := |\vec{\Delta}|$ . Bei der SIM mit Liniengitter kann die Verschieberichtung  $\theta$  im Prinzip beliebig gewählt werden. Nur für die Wahl  $\theta = 90^\circ$  ist das Gleichungssystem (4.2) nicht mehr lösbar, da in diesem Fall alle  $\alpha_m^{(n)}$  den Wert 0 annehmen, d.h. alle Phasenbilder stimmen überein. Wählt man  $\Delta = \frac{p}{N \cos(\theta)}$ , so lauten die Phasenverschiebungen

$$\alpha_m^{(n)} = (m-1) \cdot n \cdot \frac{2\pi}{N} \quad . \quad (4.5)$$

Die Matrix  $\hat{A}_{m,n} = e^{-i(m-1)n \frac{2\pi}{N}}$  ist für diese spezielle Wahl proportional zu der Matrix  $\hat{W}$  (siehe Gleichung (A.8)), welche die Fouriertransformation vermittelt und ist daher proportional zu einer unitären Matrix. Wie in Anhang A erläutert, ergibt sich in diesem Fall für die Matrix  $\hat{A}$  die minimal mögliche Konditionszahl von  $K = 1$  und daher eine minimale Fehlerfortpflanzung der Messfehler in die Auswertung.

## 4.1. SIM mit Schachbrettmustern

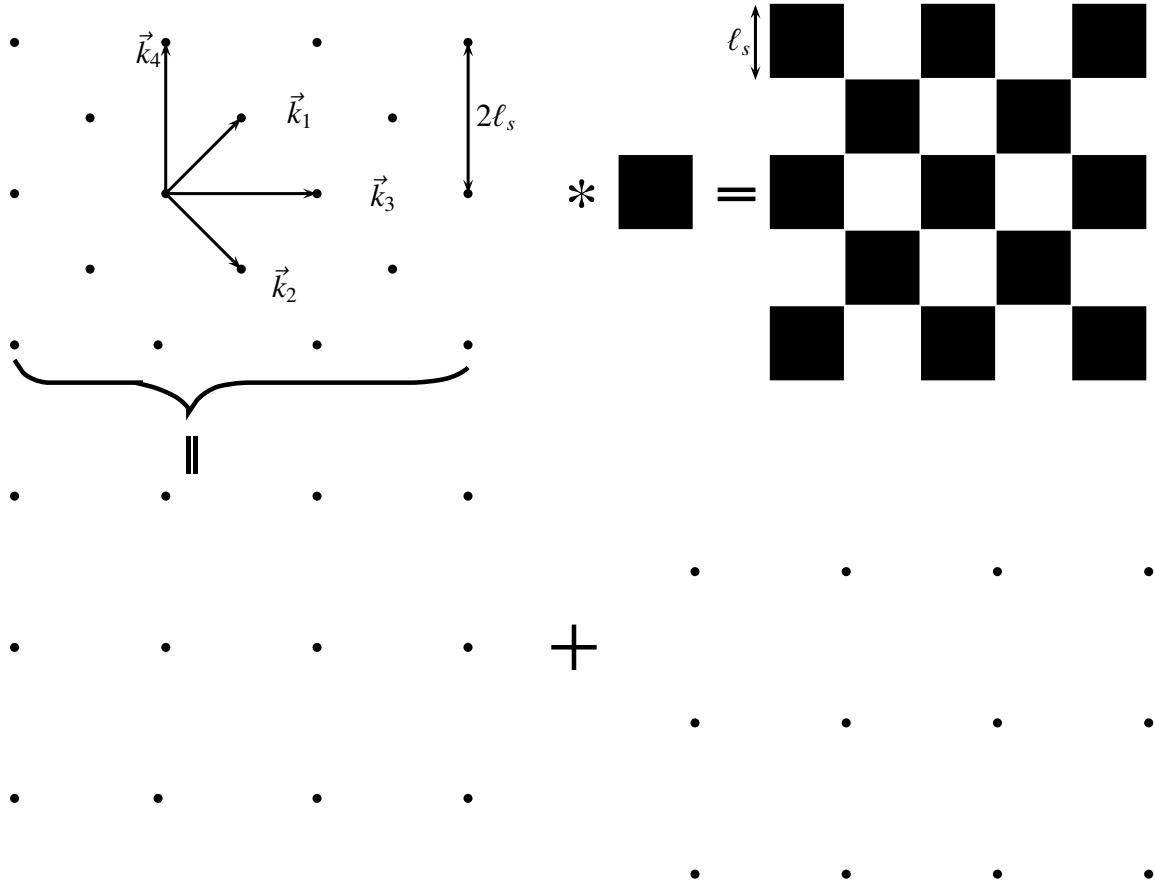
Im diesem Abschnitt wird zunächst nur die quasikonfokale SIM betrachtet. Wie in der ersten Patentschrift zur strukturierten Beleuchtung von 1992 [Mor92], wird ein Schachbrettmuster für die Transmissionsmaske der SIM angenommen. Es wird gezeigt, dass alle zur Auswertung notwendigen Phasenbilder unter Verschiebung des Musterbildes in nur einer einzigen Richtung erzeugt werden können.

Wie in Abbildung (4.1) illustriert, lässt sich der rein periodische Anteil eines Schachbrettmusters  $\mathfrak{S}_p$  schreiben als

$$\mathfrak{S}_p(\vec{x}_\perp) = \sum_{m,n} \delta(x - 2m\ell_s) \delta(y - 2n\ell_s) + \delta(x - (2m+1)\ell_s) \delta(y - (2n+1)\ell_s) \propto \quad (4.6)$$

$$\propto \sum_{m,n} (1 + e^{-i\pi(m+n)}) e^{i \frac{\pi}{\ell_s} (mx+ny)} = \sum_{\substack{m,n \in \mathbb{Z} \\ (m+n) \text{ gerade}}} e^{i \frac{\pi}{\ell_s} (mx+ny)} \quad (4.7)$$

Das gesamte Schachbrettmuster lässt sich als Faltung des rein periodischen Anteils  $\mathfrak{S}_p$  mit



**Abb. 4.1.:** Ein Schachbrettmuster als Faltung eines rein periodischen Musters mit einer zweidimensionalen Rechtecksfunktion als Grundmuster

dem Grundmuster darstellen:

$$\begin{aligned} \mathfrak{S}(x, y) &\propto \sum_{\substack{m, n \in \mathbb{Z} \\ (m+n) \text{ gerade}}} e^{i \frac{\pi}{\ell_s} ((x-x_0)m + (y-y_0)n)} \text{sinc}\left(\frac{\pi m}{2}\right) \text{sinc}\left(\frac{\pi n}{2}\right) = \\ &= 1 + \sum_{\substack{m, n \in \mathbb{Z} \\ m, n \text{ ungerade}}} \left( \frac{2(-1)^{\frac{m-1}{2}}}{m\pi} \right) \left( \frac{2(-1)^{\frac{n-1}{2}}}{n\pi} \right) e^{i \frac{\pi}{\ell_s} [(x-x_0)m + (y-y_0)n]} \end{aligned} \quad (4.8)$$

Aus Gleichung (4.8) lassen sich die in dem Muster in Abbildung 4.1 enthaltenen Frequenzvektoren ablesen:

$$\vec{k}_{m,n} = \frac{\pi}{\ell_s} \begin{pmatrix} m \\ n \end{pmatrix} \quad \left| \begin{array}{l} m, n \text{ ungerade oder null} \\ (m+n) \text{ gerade} \end{array} \right. \quad (4.9)$$

Die kleinstmöglichen Frequenzen (größer null) sind daher  $\pm \vec{k}_{1,\pm 1}$  und haben einen Betrag von  $\sqrt{2} \frac{\pi}{\ell_s}$  und entsprechen daher einer Periode von  $p = \sqrt{2} \ell_s$ . Falls nur der rein periodische Teil des Schachbrettmusters betrachtet wird (Gleichung (4.7)), gilt nur die Bedingung  $(m+n)$

gerade.

Wie in Abschnitt 3.2 erläutert ergibt sich bei der quasikonfokalen SIM die beste Konfokalität, wenn man für die Musterfrequenz  $\nu_g = 1$  bzw.  $p = \lambda/\text{NA}$  wählt. In diesem Fall sind im Falle inkohärenter Beleuchtung des Musters nur noch die Modulationen der Grundfrequenzen  $\vec{k}_{1,1} =: \vec{k}^{(1)}$  und  $\vec{k}_{1,-1} =: \vec{k}^{(2)}$  in der Anregungsintensität enthalten. Entsprechend Gleichung (3.10) kann man daher das  $m$ -te Phasenbild folgendermaßen schreiben:

$$I_m(x, y) = I_0 + I^{(1)} \cos \left[ \frac{\pi}{\ell_s} (x + y) - \Phi_0^{(1)} - \alpha_m^{(1)} \right] + I^{(2)} \cos \left[ \frac{\pi}{\ell_s} (x - y) - \Phi_0^{(2)} - \alpha_m^{(2)} \right] \quad (4.10)$$

Für alle Bildpunkte  $(x, y)$  ergeben sich aus  $I^{(1)}(x, y)$  und  $I^{(2)}(x, y)$  quasikonfokale Bilder. Das unmodulierte Signal  $I^{(0)}(x, y)$  ist nicht konfokal und ergibt für alle Punkte  $(x, y)$  das Epifluoreszenzbild. Die Phasenverschiebungen die sich aufgrund der Verschiebungen des Musters im  $m$ -ten relativ zum ersten Rohbild ergeben, werden für die  $n$ -te Frequenzordnung mit  $\alpha_m^{(n)}$  bezeichnet. Die  $\Phi_0^{1,2}$  bezeichnen die absoluten Phasen des Musters im ersten Rohbild ( $m = 1$ ) und hängen nur von der Wahl des Koordinatensystems  $(x, y)$  ab. Anders als in (3.10) ergeben sich hier 5 Unbekannte  $I_0, I^1, I^2, \Phi_0^{(1)}$  und  $\Phi_0^{(2)}$ . Daher müssen mindestens 5 Phasenbilder für eine quasikonfokale Auswertung aufgenommen werden.

Wird das Muster zwischen dem ersten und zweiten Phasenbild um einen Versatz  $\vec{\Delta}$  verschoben, so ergibt sich für die Phasenverschiebungen  $\alpha_2^{(n)} = \vec{k}^{(n)} \vec{\Delta} = |\vec{k}^{(n)}| \cdot |\vec{\Delta}| \cos(\angle(\vec{k}^{(n)}, \vec{\Delta}))$ . Führt man einen zunächst beliebigen Parameter  $\kappa \in \mathbb{R}$  ein, so kann man für einen beliebigen Verschiebe-Vektor  $\vec{\Delta}$  schreiben:

$$\begin{aligned} \vec{k}^{(1)} \vec{\Delta} &= \alpha_2^{(1)} \\ \vec{k}^{(2)} \vec{\Delta} &= \alpha_2^{(2)} = \kappa \alpha_2^{(1)} \end{aligned}$$

Daraus ergibt sich

$$\left. \begin{aligned} \Delta_x + \Delta_y &= \frac{\ell_s}{\pi} \alpha_2^{(1)} \\ \Delta_x - \Delta_y &= \frac{\ell_s}{\pi} \kappa \alpha_2^{(1)} \end{aligned} \right\} \Rightarrow \begin{aligned} \Delta_x &= \frac{\ell_s}{2\pi} (1 + \kappa) \alpha_2^{(1)} \\ \Delta_y &= \frac{\ell_s}{2\pi} (1 - \kappa) \alpha_2^{(1)} \end{aligned}$$

Für jeden Wert von  $\kappa$  ergibt sich theoretisch eine andere Orientierung des Verschiebevektors  $\vec{\Delta}$ . Der Orientierungswinkel der Verschiebung  $\vec{\Delta}$  relativ zur  $x$ -Achse  $\theta$  lässt sich als Funktion des Parameters  $\kappa$  schreiben:

$$\boxed{\tan(\theta) = \frac{\Delta_y}{\Delta_x} = \left( \frac{1 - \kappa}{1 + \kappa} \right)} \quad (4.11)$$

Hierbei ist zu beachten, dass die Tangensfunktion nicht auf dem gesamten Winkelbereich zwischen  $0^\circ$  und  $360^\circ$  invertierbar ist. Aufgrund dessen ist der in Gleichung (4.11) definierte Winkel nicht eindeutig. Für jeden Winkel  $\theta$  von (4.11) existiert daher immer ein zweiter Winkel  $\theta + 180^\circ$  mit dem gleichen Wert für  $\kappa$ . Geometrisch entspricht der Übergang vom einen zum anderen Winkel, einer Spiegelung am Ursprung, also  $\vec{k}^{(1)} \rightarrow -\vec{k}_1$  und  $\vec{k}^{(2)} \rightarrow -\vec{k}_2$ , bzw. einer Umkehrung der Verschieberichtung, d.h.  $\vec{\Delta} \rightarrow -\vec{\Delta}$ .

Entsprechend Gleichung (4.2) kann man auch Gleichung (4.10) in Matrixschreibweise mit einer Matrix  $\hat{A} = (a)_{m,n} = \exp(-i\alpha_m^{(n)})$  darstellen. Nimmt man an, dass zwischen den Phasenbildern immer dieselbe laterale Verschiebung  $\vec{\Delta}$  erfolgt, so ergibt sich für die Phasenverschiebungen  $\alpha_m^{(n)} = (m-1)\alpha_2^{(n)} \quad \forall n \in \{-2, \dots, 2\}$ . Wählt man für  $|\vec{\Delta}|$

$$|\vec{\Delta}| = \frac{\sqrt{2}\ell_s}{5 \cos(\angle(\vec{k}^{(1)}, \vec{\Delta}_1))} \stackrel{\theta=45^\circ + \angle(\vec{k}^{(1)}, \vec{\Delta}_1)}{=} \frac{\sqrt{2}\ell_s}{5[\frac{1}{2}\sqrt{2}\cos(\theta) + \frac{1}{2}\sqrt{2}\sin(\theta)]} \quad (4.12)$$

so ergeben sich wie in Gleichung (4.5) für die  $\alpha_m^{(1)}$  und  $\alpha_m^{(2)}$

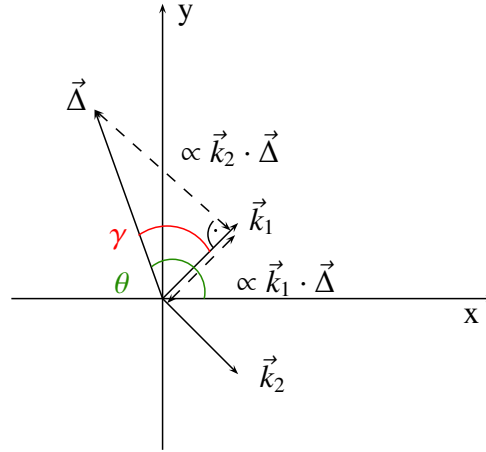
$$\alpha_m^{(1)} = (m-1)\frac{2\pi}{5} \quad \alpha_m^{(2)} = (m-1)\kappa\frac{2\pi}{5} \quad (4.13)$$

Es existieren genau zwei mögliche Werte  $\kappa \in [0, \dots, 4] \subset \mathbb{Z}$ , die zu einer unitären Matrix  $\hat{A} = (a)_{m,n} = \exp(-i\alpha_m^{(n)})$  führen. Diese sind  $\kappa_1 = 2$  und  $\kappa_2 = 3$ . Um sich davon zu überzeugen, kann man sich z.B. die Phasenverschiebungen der zweiten Zeile der Matrix  $\hat{A}$  überlegen:

$$\alpha_2^{(n)} = \frac{2\pi}{5} (0, 1, -1, \kappa, -\kappa) \triangleq \frac{2\pi}{5} (0, 1, 4, \kappa, 5-\kappa) \quad (4.14)$$

Die Werte von  $\kappa$ , bei denen sich für die Phasenverschiebungen  $\alpha_2^{(n)}$  in Gleichung (4.14) paarweise verschiedene Werte im Intervall  $[0, \dots, 4] \subset \mathbb{Z}$  ergeben, führen zu einer unitären Matrix  $\hat{A}$ . Das ist sowohl für  $\kappa_1 = 2$  als auch  $\kappa_2 = 3$  der Fall. Diese beiden Werte für  $\kappa$  entsprechen gemäß Gleichung (4.11) zwei verschiedenen Orientierungswinkeln des Verschiebevektors  $\vec{\Delta}$  relativ zur  $x$ -Achse des gewählten Koordinatensystems.

Die beiden möglichen Orientierungen des Verschiebevektors  $\vec{\Delta}$  sind bzgl. der Auswertung zu einem quasikonfokalen Bild nicht gleichwertig. Einerseits hängt der Betrag der Verschiebung  $|\vec{\Delta}|$  nach Gleichung (4.12) von der Orientierung der Verschiebung und damit von  $\kappa$  ab. Da die insgesamt maximal mögliche Verschiebung des Musters im Experiment beschränkt ist, sollte der Wert für  $\kappa$  gewählt werden, für den sich die kleinere Gesamtverschiebung  $(N-1)\Delta$  ergibt. Das ist in diesem Fall  $\theta_1 = \arctan\left(\frac{-1}{3}\right)$ . Andererseits ist der Fehler zu beachten, der sich für



**Abb. 4.2.:** Geometrie der betrachteten Frequenzvektoren im benutzten Koordinatensystem

den Parameter  $\kappa$  selbst bei einer bestimmten Orientierung ergibt. Aus Abbildung (4.2) sieht man, dass  $\gamma := \theta - 45^\circ$  und

$$\kappa = (\vec{k}^{(2)} \cdot \vec{\Delta}) / (\vec{k}^{(1)} \cdot \vec{\Delta}) = \tan(\gamma) \quad (4.15)$$

Für den Fehler ergibt das

$$\delta\kappa = \delta(\tan(\gamma)) = (1 + \tan^2(\gamma))\delta\gamma = (1 + \kappa^2)\delta\theta \quad (4.16)$$

Insgesamt heißt das, in Übereinstimmung mit den Überlegungen bzgl. des gesamten Verschiebebetrages, dass der Orientierungswinkel  $\theta_1$  der nach Gleichung (4.11)  $\kappa_1 = 2$  entspricht bevorzugt werden sollte:

$$\boxed{\theta_1 = \arctan\left(-\frac{1}{3}\right) \approx -18,435^\circ}$$

Der zweite mögliche Winkel ist  $\theta_2 = \arctan\left(-\frac{1}{2}\right) \approx -26,565^\circ$ . Legt man den Verschiebevektor o.B.d.A. in die  $x$ -Richtung, und dreht das Muster entsprechend um  $-\theta_1$  so ergibt sich das für das  $m$ -te Phasenbild aus Gleichung (4.10)

$$I_m(x, y) = I_0 + I^{(1)} \cos\left(\frac{2\pi}{\sqrt{10}\ell_s}(2x + y) + \Phi_0^{(1)} - (m-1)\frac{2\pi}{5}\right) + \\ + I^{(2)} \cos\left(\frac{2\pi}{\sqrt{10}\ell_s}(x - 2y) + \Phi^{(2)}(\vec{x}) - (m-1)\frac{4\pi}{5}\right), \quad (4.17)$$

falls man das Muster von einem zum nächsten Phasenbild um einen Betrag  $\Delta = \sqrt{\frac{2}{5}}\ell_s$  ver-

#### 4. Strukturierte Beleuchtung mit zweidimensionalen Mustern

schiebt. Das Gleichungssystem (4.17) lautet dann in Matrixschreibweise:

$$\begin{pmatrix} I_1 \\ I_2 \\ I_3 \\ I_4 \\ I_5 \end{pmatrix} = \overbrace{\begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & \exp(-i\frac{2\pi}{5}) & \exp(-i\frac{8\pi}{5}) & \exp(-i\frac{4\pi}{5}) & \exp(-i\frac{6\pi}{5}) \\ 1 & \exp(-i\frac{4\pi}{5}) & \exp(-i\frac{6\pi}{5}) & \exp(-i\frac{8\pi}{5}) & \exp(-i\frac{2\pi}{5}) \\ 1 & \exp(-i\frac{6\pi}{5}) & \exp(-i\frac{4\pi}{5}) & \exp(-i\frac{2\pi}{5}) & \exp(-i\frac{8\pi}{5}) \\ 1 & \exp(-i\frac{8\pi}{5}) & \exp(-i\frac{2\pi}{5}) & \exp(-i\frac{6\pi}{5}) & \exp(-i\frac{4\pi}{5}) \end{pmatrix}}^{=: \hat{A}} \begin{pmatrix} I^{(0)} \\ \frac{1}{2}I^{(1)}e^{i\vec{k}^{(1)}\vec{x}}e^{i\Phi_0^{(1)}} \\ \frac{1}{2}I^{(1)}e^{-i\vec{k}^{(1)}\vec{x}}e^{-i\Phi_0^{(1)}} \\ \frac{1}{2}I^{(2)}e^{i\vec{k}^{(2)}\vec{x}}e^{i\Phi_0^{(2)}} \\ \frac{1}{2}I^{(2)}e^{-i\vec{k}^{(2)}\vec{x}}e^{-i\Phi_0^{(2)}} \end{pmatrix}$$

Die Inverse von  $\hat{A}$  ist proportional zu ihrer adjungierten Matrix:

$$\hat{A}^{-1} = \frac{1}{5} \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & \exp(i\frac{2\pi}{5}) & \exp(i\frac{4\pi}{5}) & \exp(i\frac{6\pi}{5}) & \exp(i\frac{8\pi}{5}) \\ 1 & \exp(i\frac{8\pi}{5}) & \exp(i\frac{6\pi}{5}) & \exp(i\frac{4\pi}{5}) & \exp(i\frac{2\pi}{5}) \\ 1 & \exp(i\frac{4\pi}{5}) & \exp(i\frac{8\pi}{5}) & \exp(i\frac{2\pi}{5}) & \exp(i\frac{6\pi}{5}) \\ 1 & \exp(i\frac{6\pi}{5}) & \exp(i\frac{2\pi}{5}) & \exp(i\frac{8\pi}{5}) & \exp(i\frac{4\pi}{5}) \end{pmatrix} \quad (4.18)$$

Die Lösungen des Gleichungssystems (4.17) kann man in den Zeilen der Matrix  $\hat{A}^{-1}$  in (4.18) ablesen:

$$I^{(0)} = \frac{1}{5}(I_1 + I_2 + I_3 + I_4 + I_5) \quad (4.19)$$

$$I^{(1)} = \frac{2}{5} \left| I_1 + I_2 e^{i\frac{2\pi}{5}} + I_3 e^{i\frac{4\pi}{5}} + I_4 e^{i\frac{6\pi}{5}} + I_5 e^{i\frac{8\pi}{5}} \right| \quad (4.20)$$

$$I^{(2)} = \frac{2}{5} \left| I_1 + I_2 e^{i\frac{4\pi}{5}} + I_3 e^{i\frac{8\pi}{5}} + I_4 e^{i\frac{2\pi}{5}} + I_5 e^{i\frac{6\pi}{5}} \right| \quad (4.21)$$

Entsprechend der Gleichung von Neil und Wilson (3.13) kann man auch beim Schachbrett mit  $N = 5$  eine reelle Auswertung finden:

$$\frac{1}{5} \sum_{m=1}^5 (I_m(\vec{x}) - I_{m+\delta}(\vec{x}))^2 = (I^{(1)})^2 (1 - \cos(\delta \frac{2\pi}{5})) + (I^{(2)})^2 (1 - \cos(\delta \frac{4\pi}{5})) \quad (4.22)$$

Für eine beliebige Wahl von  $\delta$  erhält man ein gewichtetes quadratisches Mittel der beiden Lösungen  $I^{(1)}$  und  $I^{(2)}$ , durch Auswerten von

$$\frac{1}{5} \sqrt{\sum_{m=1}^5 (I_m(\vec{x}) - I_{m+\delta}(\vec{x}))^2} = \sqrt{(I^{(1)})^2 (1 - \cos(\delta \frac{2\pi}{5})) + (I^{(2)})^2 (1 - \cos(\delta \frac{4\pi}{5}))} \quad (4.23)$$

Ein homogenes quadratisches Mittel  $\sqrt{(I^{(1)})^2 + (I^{(2)})^2}$  erhält man durch

$$\sqrt{(I^{(1)})^2 + (I^{(2)})^2} = \frac{\sqrt{2}}{5} \sqrt{\sum_{\delta=1}^2 \sum_{m=1}^5 (I_m(\vec{x}) - I_{m+\delta}(\vec{x}))^2} \quad (4.24)$$

Zur Herleitung von Gleichungen (4.23) und (4.24) siehe Anhang D.2. Auswertung von (4.23) bzw. (4.24) führt nicht nur für ein Schachbrett- sondern auch für ein Gittermuster zu einem quasikonfokalen Bild, falls 5 Bilder unter einer relativen Phasenverschiebung von  $\frac{2\pi}{5}$  aufgenommen werden.

Im Experiment wird der Winkel  $\theta$  mit einem Fehler  $\delta\theta$  behaftet sein. Da der Parameter  $\kappa$  direkt in die Matrix  $\hat{A}$  eingeht, kann ein Orientierungsfehler  $\delta\theta$  – falls  $\kappa$  bekannt ist – in der Auswertung berücksichtigt und kompensiert werden:

$$\hat{A} = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & \exp(-i\frac{2\pi}{5}) & \exp(-i\frac{8\pi}{5}) & \exp(-i\kappa\frac{2\pi}{5}) & \exp(-i\kappa\frac{8\pi}{5}) \\ 1 & \exp(-i\frac{4\pi}{5}) & \exp(-i\frac{6\pi}{5}) & \exp(-i\kappa\frac{4\pi}{5}) & \exp(-i\kappa\frac{6\pi}{5}) \\ 1 & \exp(-i\frac{6\pi}{5}) & \exp(-i\frac{4\pi}{5}) & \exp(-i\kappa\frac{6\pi}{5}) & \exp(-i\kappa\frac{4\pi}{5}) \\ 1 & \exp(-i\frac{8\pi}{5}) & \exp(-i\frac{2\pi}{5}) & \exp(-i\kappa\frac{8\pi}{5}) & \exp(-i\kappa\frac{2\pi}{5}) \end{pmatrix} \quad (4.25)$$

Inversion der Matrix  $\hat{A}$  ergibt dann eine Auswertung unter Berücksichtigung des Fehlers  $\delta\theta$ . Falls mehr als  $N = 5$  Rohbilder (unter einer relativen Phasenverschiebung von  $\frac{2\pi}{N}$ ) aufgenommen werden, kann z.B. die Pseudoinverse der Matrix  $\hat{A}$  (siehe z.B. Anhang A) zur Auswertung benutzt werden. Da bei einer Verschiebung des Musters unter einem Winkel  $\theta_1$  alle Punkte des Musters gleichermaßen abgetastet werden, kann hier auch (bei Aufnahme einer genügend großen Zahl an Phasenbildern) entsprechend Gleichung (3.9) ein quasikonfokales Bild ermittelt werden.

Auch für den Fall, dass die detektierte Intensität im Rohbild mehr als nur fünf Frequenzordnungen  $I^{(n)}$  enthält, können Verschiebewinkel  $\theta$  gefunden werden unter denen eine optimal konditionierte Lösung der Frequenzanteile auf jedem Pixel möglich ist. Insgesamt existieren solche Verschiebewinkel für  $N = 9$ ,  $N = 13$  und  $N = 25$  unbekannte  $I^{(n)}$ . Für Details hierzu siehe Anhang H.

## 4.2. SIM mit hexagonalen Mustern

Ein weiteres Muster, das sich für die SIM-Mikroskopie anbietet ist das hexagonale Gitter. Auch hier soll die Verschiebung des Musters in der Probe nur in einer Raumrichtung erfolgen. Wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, müssen bei der SR-SIM mit Linienmustern Phasenbilder für drei Orientierungen des Linienmusters aufgenommen werden. Da das hexagonale Muster Frequenzen in diesen drei Orientierungsrichtungen enthält, bietet es sich gerade für die

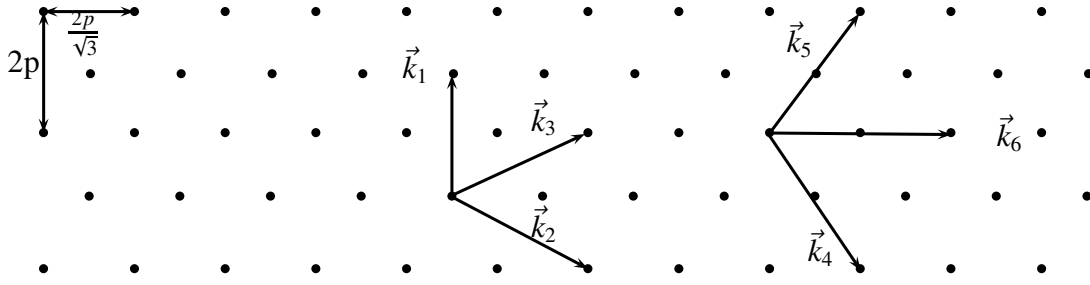


Abb. 4.3.: Das hexagonale Muster, wie es in Gleichung (4.26) definiert ist.

SR-SIM an. Die Fourierdarstellung des rein periodischen Anteils eines hexagonalen Musters  $\mathfrak{H}_p(\vec{x}_\perp)$  mit Grundperiode  $p$

$$\mathfrak{H}_p(\vec{x}) = \sum_{m,n} \delta\left(x - m\frac{2p}{\sqrt{3}}\right) \delta(y - n2p) + \sum_{m,n} \delta\left(x - \left(m + \frac{1}{2}\right)\frac{2p}{\sqrt{3}}\right) \delta\left(y - \left(n + \frac{1}{2}\right)2p\right) \quad (4.26)$$

lautet:

$$\mathfrak{H}_p(\vec{x}) = \sum_{m,n} c_{m,n} (1 + e^{-i(m\pi + n\pi)}) e^{i(m\sqrt{3}\frac{x}{p} + n\frac{y}{p})} = 2 \sum_{\substack{m,n \\ (m+n) \text{ gerade}}} c_{m,n} e^{i(m\sqrt{3}\frac{x}{p} + n\frac{y}{p})} \quad (4.27)$$

Die Faltung mit einem Grundmuster ergibt dann z.B. ein hexagonales Transmissionsmuster  $T(\vec{x})$  für die quasikonfokale SIM. Als Grundmuster können z.B. kleine Hexagons [Xi02] oder Kreise gewählt werden. Die im Muster enthaltenen Frequenzen kann man aus Gleichung (4.27) ablesen:

$$\vec{k}_{m,n} = \frac{\pi}{p} \begin{pmatrix} m\sqrt{3} \\ n \end{pmatrix} \Bigg|_{(m+n) \text{ gerade}} \quad (4.28)$$

Daraus folgt, dass die drei Grundfrequenzen (die Frequenzen mit den kleinstmöglichen von null verschiedenen Beträgen) des hexagonalen Musters einen Frequenzbetrag von  $|\vec{k}| = \frac{2\pi}{p}$  haben und gegeben sind durch:

$$\vec{k}_{0,2} = \frac{2\pi}{p} \begin{pmatrix} 0 \\ 1 \end{pmatrix} =: \vec{k}^{(1)} \quad \vec{k}_{1,-1} = \frac{\pi}{p} \begin{pmatrix} \sqrt{3} \\ -1 \end{pmatrix} =: \vec{k}^{(2)} \quad \vec{k}_{1,1} = \frac{\pi}{p} \begin{pmatrix} \sqrt{3} \\ 1 \end{pmatrix} =: \vec{k}^{(3)} \quad (4.29)$$

Es ist zu beachten, dass die Grundperiode des hexagonalen Musters nicht dem minimalen Abstand zweier benachbarter Punkte in Abbildung 4.3 entspricht, sondern dem Abstand zweier benachbarter Zeilen. Die drei Frequenzvektoren (4.29) erfüllen die Bedingung

$$\vec{k}^{(1)} + \vec{k}^{(2)} = \vec{k}^{(3)} \quad (4.30)$$



### 4.2.1. Quasikonfokale hexagonale SIM

In diesem Abschnitt wird von inkohärenter Beleuchtung ausgegangen und es wird nur die quasikonfokale SIM betrachtet. Eine hexagonal modulierte Chromschicht auf Quarzglas wird mit Licht einer bestimmten Wellenlänge  $\lambda$  inkohärent beleuchtet zur Anregung eines linearen Fluoreszenzprozesses auf die mikroskopische Probe abgebildet. Wie in Abschnitt 3.2 erläutert ergibt sich bei der SIM die beste Konfokalität, wenn man für die Gitterfrequenz gerade  $\nu_g = 1$ , d.h.  $p = \lambda/\text{NA}$  wählt. In diesem Fall enthält die Anregungsintensität nur die Grundfrequenzen (Gleichung (4.29)) des hexagonalen Musters (und die Nullfrequenz). Das  $m$ -te Phasenbild lautet für einen beliebigen Bildpunkt  $(x, y)$ :

$$\begin{aligned} I_m(x, y) = & I^{(0)}(\vec{x}_\perp) + I^{(1)}(\vec{x}_\perp)m_1 \cos\left(\frac{2\pi}{p}y + \Phi_0^{(1)} - \alpha_m^{(1)}\right) + \\ & + I^{(2)}(\vec{x}_\perp)m_2 \cos\left(\frac{\pi}{p}(\sqrt{3}x - y) + \Phi_0^{(2)} - \alpha_m^{(2)}\right) + \\ & + I^{(3)}(\vec{x}_\perp)m_3 \cos\left(\frac{\pi}{p}(\sqrt{3}x + y) + \Phi_0^{(3)} - \alpha_m^{(3)}\right) \end{aligned} \quad (4.31)$$

Hierbei bezeichnen  $I^{(n)}(\vec{x}_\perp) \cdot m_n$  ( $n \in \{1, 2, 3\}$ ) die Modulationen der drei Hexagon Grundfrequenzen im detektierten Rohbild. Für alle Bildpunkte zusammen ergeben diese Modulationswerte ein quasikonfokales mikroskopisches Bild. Die Modulationen der hexagonalen Anregungsintensität in der Probe werden mit  $m_n$  bezeichnet.

Das unmodulierte Signal  $I^{(0)}$  ist nicht konfokal und entspricht für alle Bildpunkte dem Epifluoreszenzbild.  $\Phi_0^{(n)}$  sind die Phasen der Grundfrequenzen im ersten Rohbild ( $m=1$ ) und hängen nur von der absoluten Lage des Musters relativ zum gewählten Koordinatensystem  $(x, y)$  ab. Die  $\alpha_m^{(n)}$  bezeichnen wieder die Phasenverschiebungen der  $n$ -ten Frequenzordnung im  $m$ -ten relativ zum ersten Rohbild ( $(\alpha_1^n = 0 \forall n \in \{1, 2, 3\})$ ).

Für mehrere Phasenbilder ( $m \in \{1, \dots, N\}$ ) wird aus Gleichung (4.31) ein lineares Gleichungssystem mit sieben unbekannten Größen:  $I_0, I^{(1)}, I^{(2)}, I^{(3)}, \Phi^{(1)}, \Phi^{(2)}, \Phi^{(3)}$ . Es sind also mindestens  $N = 7$  Phasenbilder notwendig. Wenn man annimmt, dass das Musterbild in der Probe zwischen der Aufnahme des ersten und zweiten Phasenbildes um einen Versatz  $\vec{\Delta}$  verschoben wird, so erhält man für die relativen Phasenverschiebungen im 2. Rohbild

$$\alpha_2^{(n)} = \vec{k}^{(n)} \vec{\Delta} \quad .$$

#### 4. Strukturierte Beleuchtung mit zweidimensionalen Mustern

---

Wenn man wie in Abschnitt 4.1 einen Parameter  $\kappa \in \mathbb{R}$  einführt, ergibt sich speziell für  $\vec{k}^{(1)}$  und  $\vec{k}^{(2)}$ :

$$\vec{k}^{(1)} \vec{\Delta} = \alpha_2^{(1)} \quad (4.32)$$

$$\vec{k}^{(2)} \vec{\Delta} = \alpha_2^{(2)} = \kappa \alpha_2^{(1)} \quad (4.33)$$

dann gilt nach (4.30) auch

$$\vec{k}^{(3)} \vec{\Delta} = \alpha_2^{(3)} = (1 + \kappa) \alpha_2^{(1)} \quad , \quad (4.34)$$

Löst man (4.32) und (4.33) nach  $\Delta_x$  und  $\Delta_y$  auf, so erhält man

$$\begin{aligned} \Delta_x &= \frac{p(2\kappa + 1)}{2\pi\sqrt{3}} \alpha_2^{(1)} \\ \Delta_y &= \frac{p}{2\pi} \alpha_2^{(1)} \end{aligned}$$

und daraus den Orientierungswinkel  $\theta$ :

$$\boxed{\tan(\theta) = \left( \frac{\sqrt{3}}{(2\kappa + 1)} \right)} \quad (4.35)$$

Auch hier lässt sich das Gleichungssystem (4.31) in Matrixschreibweise mit einer Matrix  $\hat{A} = (a)_{m,n}$  schreiben. Falls man auch hier annimmt, dass zwischen zwei aufeinander folgenden Phasenbildern immer dieselbe Verschiebung  $\vec{\Delta}$  erfolgt, so gilt für die Phasenfaktoren  $\alpha_m^{(n)} = (m - 1) \alpha_2^{(n)}$ . Wählt man entsprechend Gleichung (4.5) für den Betrag der Verschiebung  $\Delta$

$$\Delta = \frac{p}{7 \cos(\angle(\vec{k}^{(1)}, \vec{\Delta}))} \quad , \quad (4.36)$$

so ergibt sich:

$$\alpha_m^{(1)} = (m - 1) \frac{2\pi}{7} \quad \alpha_m^{(2)} = (m - 1) \kappa \frac{2\pi}{7} \quad \alpha_m^{(3)} = (m - 1)(\kappa + 1) \frac{2\pi}{7} \quad (4.37)$$

Analog zu dem in Abschnitt 4.1 beschriebenen Vorgehen, findet man auch hier zwei Werte für  $\kappa$ , die zu einer unitären Matrix  $\hat{A}$  führen. Die beiden möglichen Werte für  $\kappa$  lauten  $\kappa_1 = 2$  und  $\kappa_2 = 4$ . Es bieten sich also auch beim hexagonalen Muster gemäß Gleichung (4.35) zwei Orientierungswinkel  $\theta_1$  und  $\theta_2$  des Verschiebevektors  $\vec{\Delta}$  relativ zur  $x$ -Achse an. Setzt man die Winkel  $\theta_1$  und  $\theta_2$  in Gleichung (4.36) ein, so sieht man dass die Wahl von  $\theta_1$  zu einer kleineren Gesamtverschiebung  $(N - 1)\Delta$  führt. Für den Fehler des Parameter  $\kappa$  in Abhängigkeit des Winkelfehlers  $\delta\theta$  ergibt sich

$$\delta\kappa = \frac{1}{2} \sqrt{3}(1 + \kappa^2) \quad . \quad (4.38)$$

Aufgrund dessen ist es im Experiment besser – falls man die Wahl hat – den Winkel

$$\theta_1 = \arctan\left(\frac{\sqrt{3}}{5}\right) \approx 19,107^\circ \quad (4.39)$$

zu wählen. Der zweite mögliche Winkel ist  $\theta_2 = \arctan \frac{\sqrt{3}}{9} \approx 10,893^\circ$ . Aufgrund der Symmetrie des hexagonalen Musters und unter Berücksichtigung der negativen Frequenzrichtungen sieht man, dass die Winkel  $\{n60^\circ \pm \theta_1 | n \in \mathbb{Z}\}$  als Orientierungswinkel äquivalent zu  $\theta_1$  sind. Für die Wahl  $\kappa_1 = 2$  lautet das Gleichungssystem (4.31) in Matrixschreibweise:

$$\begin{pmatrix} I_1 \\ I_2 \\ I_3 \\ I_4 \\ I_5 \\ I_6 \\ I_7 \end{pmatrix} = \overbrace{\begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & e^{-i\frac{2\pi}{7}} & e^{-i\frac{12\pi}{7}} & e^{-i\frac{4\pi}{7}} & e^{-i\frac{10\pi}{7}} & e^{-i\frac{6\pi}{7}} & e^{-i\frac{8\pi}{7}} \\ 1 & e^{-i\frac{4\pi}{7}} & e^{-i\frac{10\pi}{7}} & e^{-i\frac{8\pi}{7}} & e^{-i\frac{6\pi}{7}} & e^{-i\frac{12\pi}{7}} & e^{-i\frac{2\pi}{7}} \\ 1 & e^{-i\frac{6\pi}{7}} & e^{-i\frac{8\pi}{7}} & e^{-i\frac{12\pi}{7}} & e^{-i\frac{2\pi}{7}} & e^{-i\frac{4\pi}{7}} & e^{-i\frac{10\pi}{7}} \\ 1 & e^{-i\frac{8\pi}{7}} & e^{-i\frac{6\pi}{7}} & e^{-i\frac{2\pi}{7}} & e^{-i\frac{12\pi}{7}} & e^{-i\frac{10\pi}{7}} & e^{-i\frac{4\pi}{7}} \\ 1 & e^{-i\frac{10\pi}{7}} & e^{-i\frac{4\pi}{7}} & e^{-i\frac{6\pi}{7}} & e^{-i\frac{8\pi}{7}} & e^{-i\frac{2\pi}{7}} & e^{-i\frac{12\pi}{7}} \\ 1 & e^{-i\frac{12\pi}{7}} & e^{-i\frac{2\pi}{7}} & e^{-i\frac{10\pi}{7}} & e^{-i\frac{4\pi}{7}} & e^{-i\frac{6\pi}{7}} & e^{-i\frac{8\pi}{7}} \end{pmatrix}}^{=: \hat{A}} \begin{pmatrix} I^{(0)} \\ \frac{m_1}{2} I^{(1)} e^{i\vec{k}^{(1)} \cdot \vec{x}} e^{i\Phi_0^{(1)}} \\ \frac{m_2}{2} I^{(1)} e^{-i\vec{k}^{(1)} \cdot \vec{x}} e^{-i\Phi_0^{(1)}} \\ \frac{m_2}{2} I^{(2)} e^{i\vec{k}^{(2)} \cdot \vec{x}} e^{i\Phi_0^{(2)}} \\ \frac{m_2}{2} I^{(2)} e^{-i\vec{k}^{(2)} \cdot \vec{x}} e^{-i\Phi_0^{(2)}} \\ \frac{m_3}{2} I^{(3)} e^{i\vec{k}^{(3)} \cdot \vec{x}} e^{i\Phi_0^{(3)}} \\ \frac{m_3}{2} I^{(3)} e^{-i\vec{k}^{(3)} \cdot \vec{x}} e^{-i\Phi_0^{(3)}} \end{pmatrix}$$

Für die Lösungen  $I^{(n)} = |I^{(n)} e^{i\vec{k}^{(n)} \cdot \vec{x}} e^{i\Phi_0^{(n)}}|$  ergeben sich hier:

$$I^{(0)} = \frac{1}{7} (I_1 + I_2 + I_3 + I_4 + I_5 + I_6 + I_7) \quad (4.40)$$

$$I^{(1)} = \frac{2}{7m_1} \left| I_1 + I_2 e^{i\frac{2\pi}{7}} + I_3 e^{i\frac{4\pi}{7}} + I_4 e^{i\frac{6\pi}{7}} + I_5 e^{i\frac{8\pi}{7}} + I_6 e^{i\frac{10\pi}{7}} + I_7 e^{i\frac{12\pi}{7}} \right| \quad (4.41)$$

$$I^{(2)} = \frac{2}{7m_2} \left| I_1 + I_2 e^{i\frac{4\pi}{7}} + I_3 e^{i\frac{8\pi}{7}} + I_4 e^{i\frac{12\pi}{7}} + I_5 e^{i\frac{2\pi}{7}} + I_6 e^{i\frac{6\pi}{7}} + I_7 e^{i\frac{10\pi}{7}} \right| \quad (4.42)$$

$$I^{(3)} = \frac{2}{7m_3} \left| I_1 + I_2 e^{i\frac{6\pi}{7}} + I_3 e^{i\frac{12\pi}{7}} + I_4 e^{i\frac{4\pi}{7}} + I_5 e^{i\frac{10\pi}{7}} + I_6 e^{i\frac{2\pi}{7}} + I_7 e^{i\frac{8\pi}{7}} \right| \quad (4.43)$$

Gleichungen (4.40) bis (4.43) können auch für die Auswertung mit einem Schachbrett bzw. einem Gitter benutzt werden, falls die relative Phasenverschiebung zwischen den gemessenen Phasenbildern jeweils  $\frac{2\pi}{7}$  beträgt und insgesamt (mindestens) 7 Bilder ausgewertet werden. Auch beim hexagonalen Muster kann man eine reelle Auswertung für die Infokus-Modulationen finden. Ein gewichtetes quadratisches Mittel ergibt sich aus

$$\sqrt{(I^{(1)})^2 (1 - \cos(\delta \frac{2\pi}{7})) + (I^{(2)})^2 (1 - \cos(\delta \frac{4\pi}{7})) + (I^{(3)})^2 (1 - \cos(\delta \frac{6\pi}{7}))} = \frac{1}{7} \sum_{m=1}^7 (I_m(\vec{x}) - I_{m+\delta}(\vec{x}))^2 \quad (4.44)$$

Ein homogenes quadratisches Mittel  $\sqrt{(I^{(1)})^2 + (I^{(2)})^2 + (I^{(3)})^2}$  erhält man durch

$$\sqrt{(I^{(1)})^2(\vec{x}) + (I^{(2)})^2(\vec{x}) + (I^{(3)})^2(\vec{x})} = \frac{\sqrt{2}}{7} \sum_{\delta=1}^3 \sum_{m=1}^7 (I_m(\vec{x}) - I_{m+\delta}(\vec{x}))^2 \quad (4.45)$$

Für die Herleitung von Gleichungen (4.44) und (4.45) siehe Anhang D.3.

Fehler in der Orientierung  $\delta\theta$  von  $\vec{\theta}$  lassen sich analog zu Abschnitt 4.1 berücksichtigen, falls man den genauen Wert für  $\kappa$  kennt.

### 4.2.2. Richtungsabhängigkeit des quasikonfokalen Signals

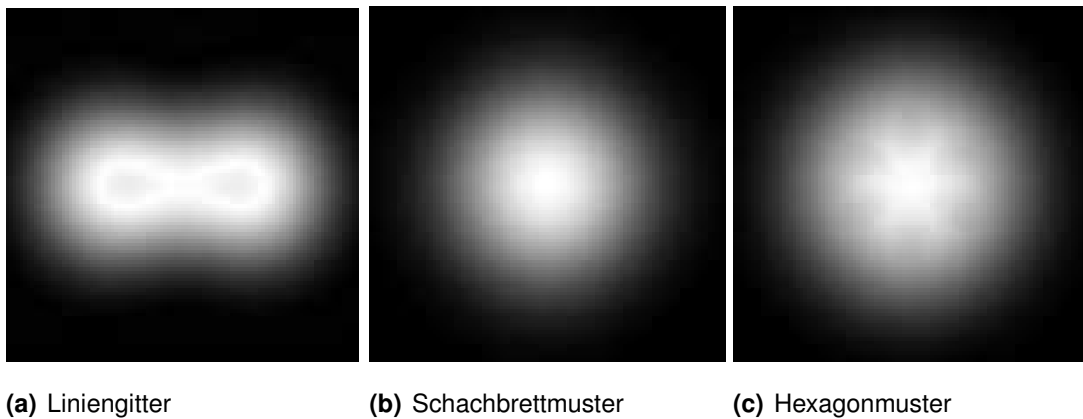
Berechnet man die MTF der quasikonfokalen SIM durch die Fouriertransformation der entsprechenden PSF, so ergibt sich in der Fouriertransformierten des quasikonfokalen Bildes ein richtungsunabhängiges Raumfrequenzspektrum.

Die Gleichungen (3.13), (4.20), (4.21), (4.23), (4.24), (4.41)-(4.45) sind allerdings alle nicht-linear bzgl. der Eingangssignale  $I_m$ . Aufgrund dessen kann das sich aus diesen Gleichungen ergebende quasikonfokale Signal nicht mehr als Antwort eines linear-translationsinvarianten Systems mit einer PSF beschrieben werden.

Nimmt man als Objekt eine einzelne räumliche Frequenz an (also eine Kosinusfunktion) und ermittelt auf diese Weise für viele Frequenzen die MTF, so sieht man, dass die Modulation im ausgewerteten quasikonfokalen Bild bei der SIM mit Liniengitter stark von der Richtung der Objektfrequenz relativ zur Richtung der Gitterfrequenz abhängt. Für alle möglichen Frequenzen innerhalb des Trägers der OTF ergibt sich so eine Modulationstransferfunktion, welche in Abbildung 4.4 für das Gitter-, das Schachbrett-, und das hexagonale Muster gezeigt sind. Man sieht deutlich, dass die MTF für die SIM mit Hexagonmuster theoretisch am wenigsten richtungsabhängig ist.

### 4.2.3. Hexagonale SR-SIM in 2D

Analog zu dem in Abschnitt 3.3 beschriebenem Verfahren, kann auch mit hexagonaler SIM mikroskopische Auflösung gesteigert werden. Im Falle der Auflösungssteigerung in zwei Di-



**Abb. 4.4.:** Berechnete MTFs für das quasikonfokale SIM Bildsignal.

mensionen  $(x, y)$  kann z.B. wie in [Hei99] ein inkohärent beleuchtetes Transmissionsmuster zur Erzeugung der strukturierten Anregung verwendet werden. Dies würde bei einer Gitterfrequenz von  $\nu_g = 1$  (bzw.  $p = \lambda/\text{NA}$ ) zu sieben Frequenzordnungen in jedem Phasenbild führen, wodurch das in Abschnitt 4.2.1 beschriebene Verfahren zur Trennung der sieben überlagerten Frequenzbänder in jedem Phasenbild benutzt werden kann.

Im Folgenden wird davon ausgegangen, dass das Transmissionsmuster wie in [Gus00b] kohärent beleuchtet, und alle bis auf die ersten Beugungsordnungen ausgeblendet werden. Bei der Wahl der Musterfrequenz von  $\nu_g = 1$ , werden die sechs ersten Beugungsordnungen die Objektivpupille an ihrem Rand passieren. Diese sechs in der Fokusebene des Mikroskopobjektivs interferierenden Beugungsordnungen führen dann insgesamt zu 19 Frequenzordnungen in der Anregungsintensität (siehe Abbildung I.1). D.h. es werden auch insgesamt 19 überlagerte Frequenzbänder in jedem Rohbild enthalten sein. Das ist auch dann der Fall, wenn wie in [Gus00a] ein kohärent beleuchtetes Phasenmuster zur Erzeugung der strukturierten Anregungsintensität benutzt wird.

Für den Fall eines Transmissionsmusters, kann wie in Abschnitt 4.2.1 eine Kreisfunktion als Grundmuster gewählt werden, wobei der Füllfaktor des Musters im Prinzip beliebig gewählt werden kann.

Bei einem Phasenmuster werden die optischen Weglängen der das Muster beleuchtenden Wellen moduliert. Wie in Anhang J erläutert, sollte bei einem binären Phasenmuster, die optische Weglängendifferenz der Mustermodulation gerade einer halben Welle entsprechen. Die so erzeugte Phasendifferenz ist somit gleich  $\pi$ . Wählt man zusätzlich – wie in Anhang J beschrieben – einen zweidimensionalen Füllfaktor von  $F_2 = 1/2$  für das Phasenmuster, so wird die

0. Beugungsordnung in der Intensität ausgelöscht. Aufgrund der in Anhang J beschriebenen Fehler der Phasenmuster (Phasenstufe, Brechungsindex, Wellenlänge) wird die 0. Beugungsordnung nie vollständig durch das Muster ausgelöscht. Daher ist es zweckmäßig im Falle von SR-SIM in 2D die 0. Beugungsordnung z.B. mit einer Blende im Strahlengang zu blockieren [Gus00b].

Es wird angenommen, dass das hexagonale Muster so orientiert ist, wie in Abbildung 4.3 gezeigt. Wird das Musterbild in der Probe unter einem Winkel  $\theta_1 = 6,59^\circ$  (relativ zur  $x$ -Achse) verschoben, so können bei einer geeigneten Wahl des Verschiebebetrages  $|\vec{\Delta}|$  Rohbilder erzeugt werden, die mit einem optimal konditionierten Gleichungssystem ausgewertet werden können. Zur Herleitung des Winkels  $\theta_1$  für  $N = 19$  siehe Anhang I.

#### 4.2.4. Hexagonale SR-SIM in 3D

Entsprechend dem in Abschnitt 3.3.3 erläuterten Verfahren, kann SIM mit hexagonalen Mustern auch für die Auflösungssteigerung in drei Dimensionen erweitert werden. Hierzu wird ein wie in Anhang J beschriebenes Phasenmuster angenommen: Das hexagonale Beugungsmuster hat eine nullte Beugungsordnung, deren Intensität etwa 80% der Intensität der ersten Beugungsordnungen beträgt. Wie in [Gus08] beschrieben, führt das aufgrund der geringeren Transmission bei größeren Winkeln durch das Mikroskopobjektiv dazu, dass die nullte und die ersten Beugungsordnungen in etwa mit der gleichen Amplitude in der Objektebene des Mikroskops interferieren. Wählt man auch hier wieder für die Musterfrequenz  $\nu_g = 1$ , so passieren nur die nullte und die ersten Beugungsordnungen die Pupille des Mikroskopobjektivs. Die Interferenz dieser sieben Beugungsordnungen führt wie in Abbildung 4.5 illustriert, zu insgesamt 31 Frequenzordnungen. In einem Rohbild sind immer nur die lateralen Frequenzordnungen sichtbar. Daher enthält ein Rohbild die Überlagerung von insgesamt 19 Frequenzbändern. Die detektierte Intensität im  $m$ -ten Phasenbild lässt sich analog zu Gleichung (3.30) schreiben:

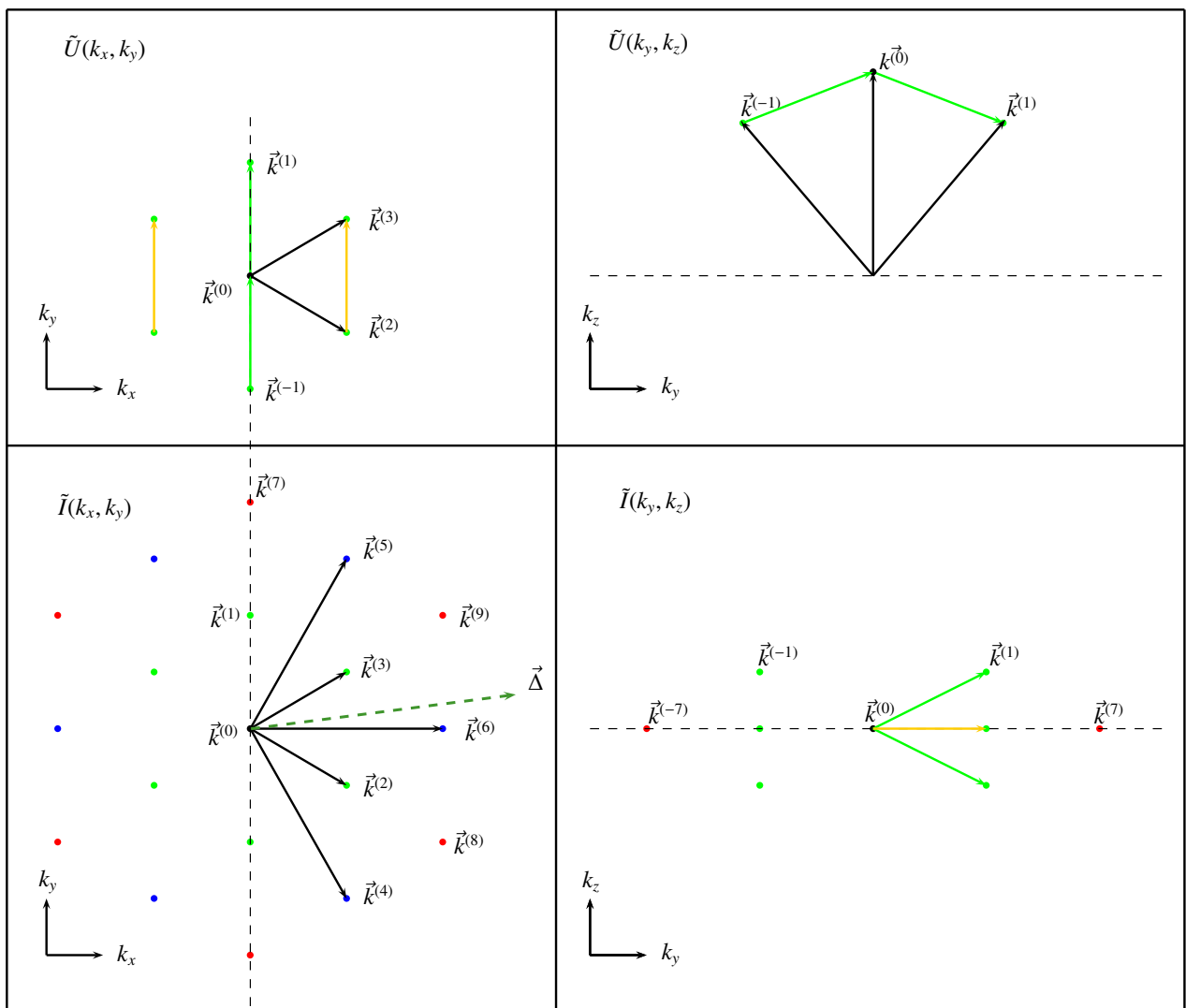
$$I_m^{\text{det.}}(x, y, z) = \sum_{n=-9}^9 \iiint d^3x' \underbrace{h^{\text{em.}}(\vec{x} - \vec{x}') \cdot I_{\parallel,n}^{\text{exc.}}(z - z') S(\vec{x}') I_{\perp,m,n}^{\text{exc.}}(x', y')}_{h_n(\vec{x} - \vec{x}')} \quad (4.46)$$

Für mehrere Phasenbilder  $m$  wird aus Gleichung (4.46) ein lineares Gleichungssystem mit 19 Unbekannten. Daraus folgt, dass der in Anhang I hergeleitete Winkel  $\theta_1 = 6,59^\circ$  als Verschie-

berichtung für dreidimensionale hexagonale SR-SIM geeignet ist. Anders als bei der SIM mit Gitter, ist hier keine Drehung des Musters notwendig, da jedes detektierte Phasenbild Frequenzbänder enthält, welche in insgesamt 6 Raumrichtungen frequenzverschoben sind.

Allerdings ist bei linearer Polarisation zu erwarten, dass die verschiedenen Modulationen der Frequenzen  $n$  in der Probe nicht alle gleich sein werden. Zum Einfluss der Polarisation siehe Anhang K. Wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben, können die unterschiedlichen Modulationen der Frequenzen bei der Überlagerung der Frequenzbänder berücksichtigt werden. Ein kleinerer Wert für die Modulation führt allerdings zu einem schlechteren Signal-zu-Rausch-Verhältnis in der Auswertung (siehe dazu Abschnitt F).

Wie in Anhang K.5 beschrieben, können die Grundfrequenzen der Anregungsintensität bei



**Abb. 4.5.:** Die Frequenzen des hexagonalen Musters in drei Dimensionen.

hexagonaler SR-SIM in einen vom Defokus  $z$  abhängigen und einen von  $z$  unabhängigen Anteil zerlegt werden. Auf diese Weise können gemäß Gleichung (K.15) auch die Modulationen  $m_n$  zerlegt werden:

$$m_n = m_n^{(z)} + m_n^{(0)}$$

Entsprechend Gleichung (3.25) kann man die Anregungsintensität im  $m$ -ten Phasenbild  $I_m^{\text{exc.}}$  folgendermaßen schreiben:

$$\begin{aligned} I_m^{\text{exc.}}(x, y, z) &= I_0 \Re \left( 1 + \sum_{n \neq 0} [m_n^{(0)} + m_n^{(z)} \cos(k_z^{(n)} z)] e^{i \vec{k}_\perp^{(n)} \cdot \vec{x}_\perp} e^{-i \alpha_m^{(n)}} \right) = \\ &= I_0 \Re \left( 1 + \sum_{n \neq 0} \underbrace{\left[ 1 + \frac{m_n^{(z)}}{m_n^{(0)}} \cos(k_z^{(n)} z) \right]}_{I_{\parallel, n}^{\text{exc.}}(z)} m_n^{(0)} e^{i \vec{k}_\perp^{(n)} \cdot \vec{x}_\perp} e^{-i \alpha_m^{(n)}} \right) \end{aligned} \quad (4.47)$$

Auf Gleichung (4.47) folgt für die Fouriertransformierte des axialen Anregungsprofils  $\tilde{I}_{\parallel, n}^{\text{exc.}}$ :

$$\tilde{I}_{\parallel, n}^{\text{exc.}} \propto \delta(k_z) + \frac{1}{2} \frac{m_n^{(z)}}{m_n^{(0)}} [\delta(k_z - k_z^{(n)}) + \delta(k_z + k_z^{(n)})]$$

Daraus folgt für die effektive OTF der  $n$ -ten Frequenzordnung  $O_n(\vec{k})$ :

$$O_n^{\text{em.}}(\vec{k}) = O^{\text{em.}}(\vec{k}) * \tilde{I}_{\parallel, n}^{\text{exc.}}(k_z) = O^{\text{em.}} * (\delta(k_z) + \frac{1}{2} \frac{m_n^{(z)}}{m_n^{(0)}} [\delta(k_z - k_z^{(n)}) + \delta(k_z + k_z^{(n)})]) \quad (4.48)$$

Für die SIM Auswertung heißt das, dass bei Berücksichtigung der Polarisierung die Modulationen  $m_n$  in dem linearen Gleichungssystem zur Lösung der Frequenzbänder (siehe z.B. Gleichung (3.18)) durch  $m_n^{(0)}$  ersetzt werden müssen, und dass die OTFs  $O_n^{\text{em.}}(\vec{k})$  aus Gleichung (4.48) bei der Überlagerung der Frequenzbänder (siehe z.B. Gleichung (3.23)) verwendet werden müssen.

### 4.3. Fehlerfortpflanzung bei quasikonfokaler 2D-SIM

Im Fall der quasikonfokalen SIM ist das Signal zu Rausch Verhältnis näherungsweise gegeben durch die in der Probe erreichte Mustermodulation  $m_n$ , das gemessene Ausserfokussignal  $I^{(0)}$ , das gemessene Infokussignal  $I^{(n)}$  und die gesamte Belichtungszeit  $T$  für die  $N$  Rohbilder:

$$\text{SNR}(I^{(n)}) \approx \frac{m_n}{2} \frac{I^{(n)}}{\sigma(I^{(0)})}$$



Bei Verwendung zweidimensionaler Muster mit dem in den Abschnitten 4.1 und 4.2 beschriebenen Verschiebewinkeln, geht auch der Fehler der Orientierung des Musters relativ zu dem Verschiebevektor  $\vec{\Delta}$  in die Auswertung mit ein.

Ist der Orientierungsfehler bekannt, so kann er in der Auswertung berücksichtigt werden. In dem Fall geht die Spektralnorm der Mischmatrix  $\|\hat{A}\|_2$  in das SNR mit ein:

$$\boxed{\text{SNR}(I^{(n)}) \approx \frac{m_n}{2} \frac{I^{(n)}}{\|\hat{A}\|_2 \sigma(I^{(0)})}} \quad (4.49)$$

Wird der Orientierungsfehler nicht in der Auswertung berücksichtigt, können bei zu großen Orientierungsfehlern Artefakte in den ausgewerteten Bildern auftreten. Typischerweise sollte der Orientierungsfehler im Experiment nicht größer sein als etwa  $0,1^\circ$ . Für eine detailliertere Herleitung der obigen Gleichungen und Erklärung siehe Anhang E.

#### 4.3.1. Vergleich der SNR für Linien- und Hexagonmuster bei inkohärenter quasikonfokaler SIM

Für einen Vergleich des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses von Strichgitter- und Schachbrett bzw. Hexagon SIM wird angenommen, dass

- die gesamte detektierte Lichtmenge
- die Struktur-Perioden der verwendeten Musters
- die verwendete Kamera
- die mikroskopische Probe
- die Mikroskopoptik

in jedem Fall dieselbe ist. Falls obige Bedingungen erfüllt sind, sind für einen Vergleich des SNR der ausgewerteten Signale  $I^{(n)}$  nach Gleichung (E.8) nur die in der Probe erzeugten Modulationen  $m_n$  der jeweiligen Muster entscheidend. Im Folgenden wird angenommen, dass die Musterfrequenz in etwa einem Wert von  $\nu = 1$  hat, d.h.  $p \approx \lambda/\text{NA}$ .

##### Gitter

Bei einer inkohärenten Abbildung des SIM-Musters auf die Probe, sind die Modulationen  $m_n$  gegeben durch das Produkt der  $n$ -ten Fourierkoeffizienten des verwendeten Musters und dem entsprechenden Wert der OTF bei dieser Frequenz. Bei der kohärenten Abbildung eines Transmissionsmusters auf die mikroskopische Probe, können alle Beugungsordnungen des Musters, die die Pupille passieren können (vgl. Abschnitt 2.4) zur Bildentstehung in der Probe beitragen. Es genügt also in jedem Fall, die Absolutbeträge der Fourierkoeffizienten der Muster zu vergleichen. Im inkohärenten Fall entsprechen die Fourierkoeffizienten des Musters den Fourierkoeffizienten der Intensität in der Ebene des Musters.

Im kohärenten Fall wird die Amplitude in der Ebene des Transmissionsmusters betrachtet, wobei wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, diejenigen Raumfrequenzen der Amplitude zur Bildentstehung in der Probe des Mikroskops beitragen, welche die Pupille des Mikroskopobjektivs passieren können. Wie in Abschnitt 2.4.5 erläutert, ist das Raumfrequenzspektrum der Intensitätsverteilung in der Probe durch die Autokorrelation dieser Amplitudenfrequenzen gegeben, d.h. die Intensität enthält 5 Raumfrequenzen. Am Beispiel des Liniengittermusters in Gleichung (2.45) sieht man, dass nur die Modulationen erster Ordnung  $m_{\pm 1}$  in  $z$ -Richtung abfallen, d.h. nur die Frequenzbänder  $D^{(\pm 1)}(\vec{x})$  sind konfokal bzw. quasikonfokal. Um alle 5 in der Intensität eines Rohbilds enthaltenen Frequenzbänder sauber zu trennen sind 5 Phasenbilder für das Liniengitter notwendig, wobei aber nur 2 dieser Bänder ein konfokales Signal enthalten. Aus diesem Grund wird bei der quasikonfokalen SIM meist inkohärentes Licht zur Anregung benutzt. Bei der Verwendung von LASERN zur quasikonfokalen SIM, werden rotierende Streuscheiben [Nei00] benutzt damit sich Interferenzanteile der Anregungsintensität zeitlich heraus mitteln, um eine (quasi-)inkohärente Abbildung des Musters auf die Probe zu erreichen.

Wie in Abschnitt 3.2 beschrieben lassen sich die SIM Muster als Faltung eines Grundmusters mit einem rein periodischen Muster beschreiben (siehe Gleichung (3.6)). Daher hängen die Beträge der Fourier-Koeffizienten der Anregungsintensität ausschließlich von der Wahl des Grundmusters  $G(\vec{x})$  ab. Bei einem Liniengitter ist das Grundmuster üblicherweise eine Rechtecksfunktion:  $G(x) = \text{rect}(2x/d)$

Die Fourier-Transformierte der Funktion  $\tilde{G}(k)$  ist proportional zu  $\text{sinc}(n\pi F)$ , wobei  $F$  der Füllfaktor des Rechtecksgitters ist ( $F = d/p$ ). Üblicherweise wird für den Füllfaktor des Liniengitters  $F = 1/2$  gewählt, da für diese Wahl alle Beugungsordnungen bei denen  $n$  gerade

ist ausgelöscht werden. Für diese Wahl erhält man bei inkohärenter Beleuchtung für das Verhältnis der Fourier-Koeffizienten erster und nullter Ordnung ein Wert von

$$\frac{m_1}{2} = \frac{c_1}{c_0} = \text{sinc}\left(\frac{\pi}{2}\right) = \frac{2}{\pi} \approx 0.637 \quad .$$

Bei kohärenter Beleuchtung ergeben sich die Fourierkoeffizienten der Intensität durch die Autokorrelation der Frequenzen der Amplitude, d.h. im Fall des Liniengitters erhält man:

$$\begin{aligned} c_0 &= \text{sinc}\left(\frac{\pi}{2}\right)^2 + \text{sinc}\left(\frac{\pi}{2}\right)^2 = 1 + 2 \cdot (2/\pi)^2 \approx 1,81 \\ c_{\pm 1} &= 1 \cdot \text{sinc}\left(\frac{\pi}{2}\right) + \text{sinc}\left(\frac{\pi}{2}\right) \cdot 1 \approx 1.27 \\ c_{\pm 2} &= \text{sinc}\left(\frac{\pi}{2}\right)^2 \approx 0,4053 \end{aligned} \quad \Rightarrow \quad \begin{aligned} \frac{m_{\pm 1}}{2} &= \frac{c_{\pm 1}}{c_0} \approx 0,70 \\ \frac{m_{\pm 2}}{2} &= \frac{c_{\pm 2}}{c_0} \approx 0,224 \end{aligned}$$

### Schachbrett

Für das Schachbrett wird – wie in Abschnitt 4.1 – beschrieben eine zweidimensionale Rechteckfunktion für das Grundmuster gewählt:

$$G(\vec{x}) = \text{rect}\left(\frac{2x}{\ell_s}\right) \text{rect}\left(\frac{2y}{\ell_s}\right)$$

Bei eindimensionalen Mustern ist der Füllfaktor definiert durch das Verhältnis der Breite des Grundmusters  $\ell_s$  zur Periode des Musters  $p$ . Dementsprechend wird der eindimensionale Füllfaktor  $F_1 = \frac{\ell_s}{p}$  für das Schachbrettmuster definiert und beträgt  $F_1 = \frac{1}{\sqrt{2}} \approx 0.7$ .

Das Verhältnis aus transmittierender Fläche zur Gesamtfläche wird als zweidimensionaler Füllfaktor  $F_2$  bezeichnet:

$$F_2 := \frac{\iint_{-\infty}^{+\infty} dx dy \, \Theta(x, y)}{\iint_{-\infty}^{+\infty} dx dy} = \frac{1}{2}$$

Die Verhältnisse der Beträge der Fourier-Koeffizienten 1-ter und 0-ter Ordnung der Intensität sind mit inkohärenter Beleuchtung beim Schachbrettmuster daher gegeben durch

$$\frac{m_{\pm(1,2)}}{2} = \frac{c_{\pm(1,2)}}{c_0} = \text{sinc}\left(k_x \frac{\ell_s}{2}\right) \text{sinc}\left(k_y \frac{\ell_s}{2}\right) = \text{sinc}\left(\frac{\pi}{\sqrt{2}} F\right)^2 = \text{sinc}\left(\frac{\pi}{2}\right)^2 = \left(\frac{2}{\pi}\right)^2 \approx 0,41 \quad .$$

Aufgrund der Tatsache, dass die zwei Lösungen, die den beiden Grundfrequenzrichtungen des Schachbrettmusters entsprechen zwei unabhängige Messungen der Infokus Emission darstellen, reduziert eine Mittelung der beiden Lösungen die Varianz um einen Faktor 2. D.h.

#### 4. Strukturierte Beleuchtung mit zweidimensionalen Mustern

---

dass eine Mittelung dieser beiden unabhängigen Messungen im Vergleich zum Liniengitter aufgrund von  $2 \left(\frac{2}{\pi}\right)^2 \approx 1.274 \cdot 0.673$  zu einem um etwa  $\sqrt{1.274} \approx 1,13$  größerem SNR im quasikonfokalen Bild führt.

Bei kohärenter Beleuchtung erhält man durch die Autokorrelation der Amplitudenfrequenzen

$$\begin{aligned} c_0 &= 1^2 + 4 \cdot 0,41^2 \approx 1,67 \\ c_{\pm 1} &= c_{\pm 2} = 1 \cdot 0,41 + 0,41 \cdot 1 \approx 0,82 \Rightarrow \\ c_{\pm 3} &= c_{\pm 4} = 0,41^2 \approx 0,17 \end{aligned} \quad \Rightarrow \quad \boxed{\begin{aligned} \frac{m_{\pm(1,2)}}{2} &= \frac{c_{\pm(1,2)}}{c_0} \approx 0,49 \\ \frac{m_{\pm(3,4)}}{2} &= \frac{c_{\pm(3,4)}}{c_0} \approx 0,10 \end{aligned}}$$

Auch hier können die quasikonfokalen Bilder  $I^{(1)}$  und  $I^{(2)}$  gemittelt werden. Daher erhält man beim Schachbrettmuster mit kohärenter Beleuchtung ein SNR, das etwa  $\sqrt{1,4} \approx 1,2$  mal größer ist als beim Liniengitter.

#### Hexagon

Beim hexagonalen Muster wurde für das Grundmuster ein Kreis mit Radius  $R$  gewählt:

$$\text{circ}\left(\frac{\vec{r}}{2R}\right) := \begin{cases} 1, & \text{falls } |\vec{r}| \leq R \\ 0, & \text{sonst} \end{cases}$$

Der eindimensionale Füllfaktor beim hexagonalen Muster ist gegeben durch  $F_1 = 2R/p$ . Die im Muster enthaltenen Frequenzen werden durch die Fouriertransformierte der Kreisfunktion apodisiert. Diese ist gegeben durch

$$2 \frac{J_1(|\vec{k}|R)}{|\vec{k}|R} = 2 \frac{J_1(|\vec{k}|\frac{F_1 p}{2})}{|\vec{k}|\frac{F_1 p}{2}} \quad (4.50)$$

Analog zum Gitter- und Schachbrettmuster, wird für den Füllfaktor ein Wert gewählt, für den die zweiten Frequenzordnungen eliminiert werden. Die Beträge der Grundfrequenzen beim Hexagon sind  $|\vec{k}| = 2\pi/p$ . Der nächst größere Frequenzbetrag, der im Raumfrequenzspektrum des hexagonalen Musters enthalten ist, ist gerade  $|\vec{k}| = \sqrt{3} \cdot 2\pi/p$ . Eingesetzt in (4.50) ergibt das folgende Bedingung für den Füllfaktor  $F_1$ :

$$2 \frac{J_1(\pi F_1 \sqrt{3})}{\pi F_1 \sqrt{3}} \stackrel{!}{=} 0$$

Die Besselfunktion erster Art erster Ordnung  $J_1(x)$  hat ihre erste Nullstelle bei  $x \approx 1,22\pi$  (vgl. Abbildung 2.3). Daraus folgt

$$F_1 = \frac{1,22}{\sqrt{3}} \approx 0,7 \ .$$

Dieser Wert von  $F_1$  entspricht in etwa einem zweidimensionalen Füllfaktor von  $F_2 \approx \frac{1}{3}$ . Für die Grundfrequenz ergibt sich bei dieser Wahl von  $F_1$  ein Verhältnis der Fourierkoeffizienten erster Ordnung und nullter Ordnung

$$\frac{m_{\pm(1,2,3)}}{2} = \frac{c_{\pm(1,2,3)}}{c_0} = 2 \frac{J_1(0,7\pi)}{0.7\pi} \approx 0,5057$$

Jede der Lösungen (4.41) - (4.43) hat also ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis, welches etwa  $\sqrt{\frac{0.5057}{2/\pi}} \approx 89,13\%$  des SNR bei Verwendung eines Linienmusters entspricht. Mittelung über alle drei Lösungen führt auf ein SNR, das um einen Faktor  $\sqrt{3} \cdot 0,8913 \approx 1,54$  größer ist als im Fall des Strichgitters. Der relative Fehler bei quasikonfokaler inkohärenter SIM ist daher bei Verwendung hexagonaler Muster um einen Faktor 0,65 kleiner als bei Verwendung von Linienmustern. Im Fall kohärenter Beleuchtung ergibt die Autokorrelation der Frequenzen der Amplitude:

$$\begin{aligned} c_0 &= 1^2 + 6 \cdot 0,5057^2 \approx 2,53 \\ c_{\pm 1} &= c_{\pm 2} = c_{\pm 3} = 2 \cdot 1 \cdot 0,5057 + 2 \cdot 0,5057^2 \approx 1,52 \Rightarrow \\ c_{\pm 4} &= c_{\pm 5} = c_{\pm 6} = 2 \cdot 0,5057^2 \approx 0,51 \\ c_{\pm 7} &= c_{\pm 8} = c_{\pm 9} = 0,5057^2 \approx 0,26 \end{aligned}$$

$\frac{m_{\pm(1,2,3)}}{2} = \frac{c_{\pm(1,2,3)}}{c_0} \approx 0,60$
$\frac{m_{\pm(4,5,6)}}{2} = \frac{c_{\pm(4,5,6)}}{c_0} \approx 0,20$
$\frac{m_{\pm(7,8,9)}}{2} = \frac{c_{\pm(7,8,9)}}{c_0} \approx 0,10$

Eine Mittelung der drei unabhängigen quasikonfokalen Bilder  $I^{(1)}$ ,  $I^{(2)}$  und  $I^{(3)}$  reduziert die Varianz des SIM Bildes um ein Drittel. Das SNR ist daher im Vergleich zum Liniengitter bei hexagonaler kohärenter Beleuchtung um einen Faktor von  $\sqrt{2,57} \approx 1,60$  größer.

## 4.4. Fehlerfortpflanzung bei Superresolution SIM

Im Fall von Superresolution SIM ist das SNR für das rekonstruierte Objekt als Funktion der Raumfrequenz  $\vec{k}$  gegeben durch:

$$SNR[\tilde{S}(\vec{k})] \propto \frac{1}{\|\hat{A}\|_2} \frac{\sum_{n=-\lfloor \frac{N}{2} \rfloor}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} O^*(\vec{k} + \vec{k}^{(n)}) \tilde{D}^{(n)}(\vec{k} + \vec{k}^{(n)})}{\langle \text{Var}[I^{(0)}(\vec{x})] \rangle_{\vec{x}} \sqrt{1 + 2 \sum_{n=1}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} \frac{4}{m_n^2} |O_n(\vec{k} + \vec{k}^{(n)})|^2}} \quad (4.51)$$

Wie im quasikonfokalen Fall, hängt das SNR vom detektierten Signal der Bänder  $\tilde{D}^{(n)}(\vec{k} + \vec{k}^{(n)})$ , vom Rauschen des detektierten Ausserfokussignals  $\text{Var}[I^{(0)}]$  und damit auch von der gesamten

Belichtungszeit  $T$  über alle Rohbilder, der in der Probe erreichten Mustermodulationen  $m_n$  und der Spektralnrm der Mischmatrix  $\|\hat{A}\|_2$  ab. Zur Herleitung von Gleichung (4.51) siehe Anhang F.

##### 4.4.1. Vergleich des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses für Liniengitter- und Hexagonale SR-SIM

Beim Vergleich des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses von SR-SIM mit Liniengitter bzw. Hexagon ist folgendes zu beachten:

- Beim Hexagon werden insgesamt  $N_h = 19$  Rohbilder für jede  $z$ -Position gespeichert.
- Beim Liniengitter werden je 5 Rohbilder für 3 Orientierungen des Linienmusters, d.h. insgesamt  $N_g = 15$  Rohbilder gespeichert.

Wenn man annimmt, dass die Gesamtbelichtungszeit für Liniengitter bzw. für hexagonale Muster gleich ist, so ist die Belichtungszeit für ein Liniengitter-Rohbild  $\tau_g$  um einen Faktor  $19/15$  größer als die eines hexagonalen Rohbilds:

$$\begin{aligned} N_g \cdot \tau_g &= T_g = T_h = N_h \cdot \tau_h \\ \Rightarrow \tau_g &= \frac{19}{15} \tau_h \quad . \end{aligned}$$

Daraus folgt, dass die Amplituden der unbekannten Frequenzbänder  $\tilde{D}^{(n)}(\vec{k}) = O_n(\vec{k})\tilde{S}(\vec{k}-\vec{k}^{(n)})$  für alle Frequenzen  $n$  beim Liniengitter um einen Faktor  $19/15$  größer sind als beim Hexagon, d.h. auch die Werte des rekonstruierten Objekts sind dann im Fall des Liniengitters um einen Faktor  $19/15$  größer als beim hexagonalen Muster. Im Fall eines Poisson-verteilten Rauschens ist daher auch die Varianz beim Liniengitter um einen Faktor  $19/15$  größer als beim hexagonalen Muster bzw. ist der relative Fehler in einem einzelnen Rohbild aufgrund der größeren Belichtungszeit beim Linienmuster um einen Faktor  $\sqrt{15/19}$  kleiner als beim Hexagonmuster. Werden die Signale von Hexagon- und Linienmuster SIM auf den gleichen Wert skaliert, so gilt für die mittleren Varianzen von Hexagonmuster  $\langle \text{Var}[i_{\text{Hex}}^{(0)}(\vec{x})] \rangle_{\vec{x}}$  und Linienmuster  $\langle \text{Var}[i_{\text{Lin}}(\vec{x})] \rangle_{\vec{x}}$ :

$$\langle \text{Var}[i_{\text{Lin}}^{(0)}(\vec{x})] \rangle_{\vec{x}} = \frac{15}{19} \langle \text{Var}[i_{\text{Hex}}^{(0)}(\vec{x})] \rangle_{\vec{x}}$$

Bei der SR-SIM mit Linienmuster wird für jede Orientierung  $d$  des Linienmusters ein Gleichungssystem mit 5 Unbekannten gelöst bzw. gehen in die Berechnung jedes Frequenzbandes

insgesamt 5 Bilder ein. Die Matrixnorm der Matrix  $\hat{A}$  beträgt daher im Fall des Liniengitters  $\|\hat{A}\|_2^2 = 1/5$ . Bei der SR-SIM mit hexagonalen Mustern wird das Gleichungssystem für alle 19 Unbekannten gelöst, d.h. es gehen zur Berechnung jedes Frequenzbandes alle gemessenen 19 Bilder ein. Dementsprechend beträgt die Matrixnorm im Fall des hexagonalen Musters  $\|\hat{A}\|_2^2 = 1/19$ . Eingesetzt in Gleichung (F.4) ergibt sich schließlich für die Varianzen des rekonstruierten Objekts für Linien- bzw. Hexagonmuster:

$$\begin{aligned} \text{Var}[\tilde{S}_{\text{Hex}}(\vec{k})] &= \frac{1}{19} \frac{\frac{1}{(2\pi)^D} \langle \text{Var}[i_{\text{Hex}}^{(0)}(\vec{x})] \rangle_{\vec{x}}}{\left| \sum_{n=-9}^9 |O_n(\vec{k} + \vec{k}^{(n)})|^2 + \epsilon^2 \right|^2} \left( |O_0(\vec{k})|^2 + 2 \sum_{n=1}^9 \frac{4}{m_n^2} |O_n(\vec{k} + \vec{k}^{(n)})|^2 \right) \quad (4.52) \\ \text{Var}[\tilde{S}_{\text{Lin}}(\vec{k})] &= \frac{1}{5} \frac{\frac{1}{(2\pi)^D} \frac{15}{19} \langle \text{Var}[i_{\text{Hex}}^{(0)}(\vec{x})] \rangle_{\vec{x}}}{\left| \sum_{d=1}^3 \sum_{n=-2}^2 |O_n(\vec{k} + n\vec{k}_g^{(d)})|^2 + \epsilon^2 \right|^2} \sum_{d=1}^3 \left( |O_0(\vec{k})|^2 + 2 \sum_{n=1}^2 \frac{4}{m_{d,n}^2} |O_n(\vec{k} + n\vec{k}_g^{(d)})|^2 \right) = \\ &= \frac{3}{19} \frac{\frac{1}{(2\pi)^D} \langle \text{Var}[i_{\text{Hex}}^{(0)}(\vec{x})] \rangle_{\vec{x}}}{\left| \sum_{d=1}^3 \sum_{n=-2}^2 |O_n(\vec{k} + n\vec{k}_g^{(d)})|^2 + \epsilon^2 \right|^2} \left( 3|O_0(\vec{k})|^2 + 2 \sum_{d=1}^3 \sum_{n=1}^2 \frac{4}{m_{d,n}^2} |O_n(\vec{k} + n\vec{k}_g^{(d)})|^2 \right) \quad (4.53) \end{aligned}$$

Die Grundfrequenz des Liniengitters in der Orientierung  $d \in \{1, 2, 3\}$  wird wie in Abschnitt 3.3 mit  $\vec{k}_g^{(d)}$  bezeichnet,  $\vec{k}^{(n)}$  bezeichnet wie in Abschnitt 4.2.1 die Frequenzen des hexagonalen Musters. Die Modulationen des Liniengitters  $m_{d,n}$  bzw. des hexagonalen Musters  $m_n$  hängen sowohl von den Amplituden der interferierenden Wellen in der Probe als auch von der Polarisation der interferierenden Wellen ab. Im Folgenden wird wie in Abschnitt 2.4.5 angenommen, dass die Amplituden der interferierenden Beugungsordnungen für alle Beugungsordnungen gleich ist, d.h. die ersten Beugungsordnungen haben in der Probe dieselbe Amplitude wie die nullte Beugungsordnung. Diese Annahme ist bei den in dieser Arbeit verwendeten Phasenmustern (vgl. Anhang J) gegeben. Die Werte der Modulation der  $n$ -ten Frequenzordnung  $m_n$  bzw.  $m_{d,n}$  der Anregungsintensität werden gemäß

$$m_n = \frac{2c_n}{c_0}$$

berechnet, wobei die  $c_n$  (wie z.B. in den Gleichungen (2.48) - (2.50)) die Fourierkoeffizienten der Anregungsintensität sind.

In Abbildung 4.6 sind logarithmische Darstellungen der Varianzen von SR-SIM (Gleichung (4.52)) mit hexagonalen Mustern und Linienmustern (Gleichung (4.53)) sowie deren Differenz für die Ebene  $k_z = 0$  im Fourierraum gezeigt. Der Beitrag  $\langle \text{Var}[i_{\text{Hex}}^{(0)}(\vec{x})] \rangle$  aus Gleichungen (4.52) und (4.53) wurde vernachlässigt, da er zum Vergleich irrelevant ist. Man sieht, dass sich

die Varianzen in beiden Fällen unterschiedlich auf den Fourierraum verteilen. Bei der SR-SIM mit Liniengittern erhält man – wie zu erwarten – kleinere Varianzen für die Frequenzen innerhalb des Trägers des 0. Frequenzbandes, d.h. für die Frequenzen innerhalb der klassischen OTF  $O_0(\vec{k})$  ohne Auflösungssteigerung.

Bei der Rücktransformation von  $\tilde{S}(\vec{k})$  in den Ortsraum bleibt das Integral bzw. die Summe über die Varianzen erhalten. Für die Integrale der Varianzen gilt:

$$\frac{\iiint d^3k \text{Var}[\tilde{S}_{\text{Hex}}(\vec{k})]}{\iiint d^3k \text{Var}[\tilde{S}_{\text{Lin}}(\vec{k})]} = \frac{\iiint d^3x \text{Var}[S_{\text{Hex}}(\vec{x})]}{\iiint d^3x \text{Var}[S_{\text{Lin}}(\vec{x})]} \approx 0,2075 \quad (4.54)$$

Das bedeutet, dass der mittlere zu erwartende Fehler des rekonstruierten Objekts auf einem Bildpunkt im Fall von hexagonaler SR-SIM etwa 0,456 mal kleiner ist, als bei der SR-SIM mit Liniengittern.

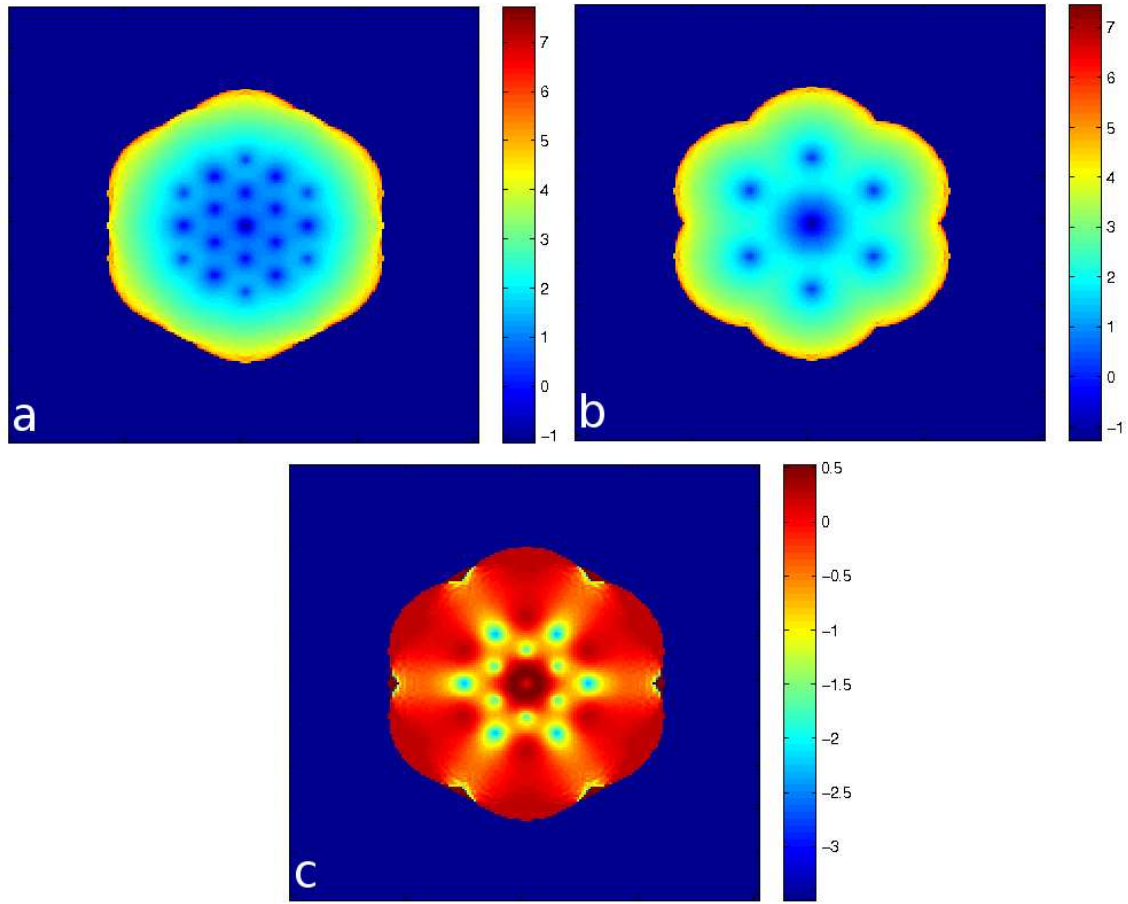
Berücksichtigt man die Polarisation der in der Probe interferierenden Lichtwellen, so erhält man andere Werte für die in der Probe erreichten Modulationen  $m_n$ , falls die elektrischen Feldstärkevektoren nicht senkrecht auf der Meridionalebene stehen, welche durch die optische Achse und den Frequenzvektor  $\vec{k}_g$  bzw.  $\vec{k}^{(n)}$  des verwendeten Musters aufgespannt wird (vgl. Anhang K). Bei Verwendung eines Linienmusters für die SIM ist es möglich die Polarisation an die jeweilige Orientierung des Musters anzupassen. Es gibt jedoch auch Arbeiten, bei denen das Muster verdreht wurde, wähen die Polarisationsrichtung der linearen Polarisation invariant blieb wie z.B. in [O’H12].

Bei Verwendung eines hexagonalen Musters entfällt die Drehung des Musters. Bleibt die Polarisation des Anregungslichts während der Aufnahme der Rohbilder invariant, so erhält man wie in Anhang K beschrieben inhomogene Anregungskontraste sowie geringere Werte der Modulationen  $m_n$  der Anregungsintensität. Die Fourierkoeffizienten der Anregungsintensität im Fall linearer Polarisation sind Tabelle K.4 in Anhang K.4 aufgelistet.

Insgesamt sieht man aus den Gleichungen (F.4), (4.52) und (4.53), dass die erwarteten Varianzen der berechneten Objektfrequenzen  $\text{Var}[\tilde{S}(\vec{k})]$  bei der SR-SIM von

- den in der Probe erreichten Modulationen  $m_n$
- der Matrixnorm  $\|\hat{A}\|_2$





**Abb. 4.6.:** Vergleich der Varianzen der SR-SIM mit hexagonalen Mustern und Liniengittern unter Vernachlässigung der Größe  $\langle \text{Var}[i_{\text{Hex}}^{(0)}(\vec{x})] \rangle$  in (4.52) und (4.53). Gezeigt ist jeweils die Varianz in der Ebene  $k_z = 0$ . a: Logarithmische Darstellung der Varianz des rekonstruierten Objekts mit hexagonaler SR-SIM. b: Logarithmische Darstellung der Varianz mit Liniengitter SR-SIM. c: Differenz der Logarithmen der Varianzen von hexagonaler und Liniengitter SR-SIM  $\log_{10}(\text{Var}[\tilde{S}_{\text{Hex}}(\vec{k})]) - \log_{10}(\text{Var}[\tilde{S}_{\text{Lin}}(\vec{k})])$ .

- der mittleren Varianz des unmodulierten (nicht-konfokalen) Signals  $\langle \text{Var}[i^{(0)}(\vec{x})] \rangle_{\vec{x}}$

abhängt. Falls  $\hat{A}$  proportional zu einer unitären Matrix ist, hängt die Matrixnorm  $\hat{A}$  nur von der Anzahl der Rohbilder ab, die in die Auswertung eingehen. Für eine Belichtungszeit von  $\tau$  für jedes Rohbild, kann der Faktor  $\|\hat{A}\|_2^2 = 1/N$  als Kehrwert der Gesamtbelichtungszeit  $1/(N\tau) = 1/T$  interpretiert werden.

Nimmt man für den Messfehler eine Poisson-Verteilung an, so ist die mittlere Varianz des unmodulierten Signals  $\langle \text{Var}[i^{(0)}(\vec{x})] \rangle_{\vec{x}}$  gegeben durch das Mittel der unmodulierten (nicht-konfokalen) gemessenen Intensität  $\langle i^{(0)}(\vec{x}) \rangle_{\vec{x}}$ . Hierbei kann man unterscheiden zwischen SR-SIM in 2D (d.h. es wird nur eine Ebene der Probe aufgenommen und ausgewertet) und SR-SIM in 3D:

- Im 2D Fall trägt sowohl Ausser- als auch Infokus Emission zum Mittelwert der gemessenen Intensität  $\langle i^{(0)}(\vec{x}) \rangle_{\vec{x}}$  bei. Je dicker die Probe, umso größer ist der detektierte Ausserfokus Anteil und umso größer wird der Wert von  $\langle i^{(0)}(\vec{x}) \rangle_{\vec{x}}$  bzw.  $\langle \text{Var}[i^{(0)}(\vec{x})] \rangle_{\vec{x}}$  in (F.4).
- Im 3D Fall wird ein Bildstapel aufgenommen, wobei die Summe über alle Intensitätswerte eines Bildes aufgrund der Energieerhaltung für jedes Bild denselben Wert ergibt. Der Mittelwert des nicht-konfokalen Signals  $\langle i^{(0)}(\vec{x}) \rangle_{\vec{x}}$  ist damit proportional zum gesamten Signal, das von der Probe emittiert wird und hängt damit – wie im 2D-Fall – hauptsächlich von der Dicke der Probe (und z.B. von der Farbstoffkonzentration in der Probe) ab.

In beiden Fällen ist (genau wie bei der quasikonfokalen SIM) die Anwendbarkeit der strukturierten Beleuchtung in der Mikroskopie beschränkt durch die gesamte Dicke der Probe. Umgekehrt lässt sich die Anwendbarkeit der SIM in der Mikroskopie steigern, indem Ausserfokusedetektion in jeder Ebene reduziert wird, d.h. indem ein Rohbild konfokal detektiert wird. In dieser Arbeit wird die SIM-Mikroskopie mit hexagonalen Mustern mit spaltkonfokaler Mikroskopie kombiniert um die Anwendung von SIM auf dicke Proben zu ermöglichen.

### 4.5. Kombination mit Spaltkonfokaler Mikroskopie

Wie in den Abschnitten E und F des vorangegangenen Kapitels erläutert, ist die größte experimentelle Einschränkung sowohl bei quasikonfokaler als auch SR-SIM die begrenzte Probendicke. Diese geht darauf zurück, dass das in den Rohbildern enthaltene Ausserfokus-Signal den Fehler im ausgewerteten Bild erhöht, bzw. anders gesagt bleibt in den ausgewerteten SIM-Bildern ein Ausserfokus-Rauschen zurück.

Um daher den Anteil der detektierten Ausserfokus-Fluoreszenz zu reduzieren und damit die maximale Probendicke bei der SIM zu vergrößern, wurde in dieser Arbeit SIM-Mikroskopie mit spaltkonfokaler Mikroskopie kombiniert. Hierbei wird das Substrat mit dem hexagonalen Phasen- bzw. Transmissionsmuster nicht flächig beleuchtet, sondern in Form einer Linie, welche (senkrecht zur Linie) über das Muster bewegt wird. Dadurch entsteht das Beleuchtungsmuster in der Probe nicht für alle Punkte der Probe simultan, sondern das Muster wird sukzessive in der Probe erzeugt.

Zur konfokalen Detektion der linienförmig angeregten Emission wird der Rolling-Shutter der

Messkamera verwendet, d.h. die Bewegung der Linie in der Probe muss mit der Bewegung des Rolling-Shutters synchronisiert werden.

### 4.5.1. Kohärente Bildentstehung periodischer Muster

Eine optische Abbildung mit kohärentem Licht kann wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, durch die Faltung der Amplitude in der Objektebene mit der in Abschnitt 2.1 definierten Amplituden-PSF  $h_a(\vec{x})$  dargestellt werden (vgl. Gleichung (2.33)).

Für die Abbildung des SIM-Musters auf die mikroskopische Probe heißt das, dass jeder Punkt der Maske gemäß dem Huygensschen Prinzip als Lichtquelle/Anregung aufgefasst wird, welche in ihrem zugehörigen Bildpunkt eine Amplitudenverteilung  $h_a(\vec{x})$  verursacht. Nimmt man in der Objektebene für die Amplitude z.B. vereinfachend eine Summe aus diskreten Lichtpunkten, also einen Dirac-Kamm mit der Periode  $p$  an, so wird aus Gleichung (2.33)

$$\begin{aligned} U_1(x_1, y_1) &= \iint_{-\infty}^{\infty} dx_0 dy_0 \sum_{m=-\infty}^{\infty} \delta(x_0 - mp) h_a(x_1 - x_0, y_1 - y_0) = \\ &= \sum_{m=-\infty}^{\infty} h_a(x_1 - mp, y_1) \end{aligned}$$

Die Intensität im Bild ergibt sich aus dem Betragsquadrat der Amplitude  $U_1(x_1, y_1)$ :

$$\begin{aligned} I_1(x_1, y_1) &= \left| \sum_{m=-\infty}^{\infty} h_a(x_1 - mp, y_1) \right|^2 \\ &= \sum_{m=-\infty}^{\infty} \sum_{n=-\infty}^{\infty} h_a(x_1 - mp, y_1) h_a^*(x_1 - np, y_1) \\ &= \sum_{m=-\infty}^{\infty} \underbrace{|h_a(x_1 - mp, y_1)|^2}_{h(x_1 - mp, y_1)} + \sum_{\substack{m, n=-\infty \\ m \neq n}}^{\infty} h_a(x_1 - mp) h_a^*(x_1 - np) \quad (4.55) \end{aligned}$$

Die erste Summe in (4.55) entspricht dem inkohärenten Bild der Punktlichtquellen. Dementsprechend ist die zweite Summe der Anteil der Bildintensität, der durch die Interferenz der Wellen im Bild entsteht. Bisher wurde die zeitliche Abhängigkeit der Amplituden  $h_a(x_1 - mp, y_1, t)$  unterdrückt. Im Integral über die Belichtungszeit ergibt sich aus (4.55):

$$\begin{aligned} I_1(x_1, y_1) &= \int_{-\frac{T}{2}}^{\frac{T}{2}} dt \sum_{m=-\infty}^{\infty} h(x_1 - mp, y_1, t) + \underbrace{\sum_{\substack{m, n=-\infty \\ m \neq n}}^{\infty} \int_{-\frac{T}{2}}^{\frac{T}{2}} dt h_a(x_1 - mp, y_1, t) h_a^*(x_1 - np, y_1, t)}_{\propto \Gamma_{mp, np}(\tau=0)} \quad (4.56) \end{aligned}$$

Der zweite Term in Gleichung (4.56) ist die Summe über die Kreuzkorrelationen der Amplituden-PSFs und ihre Glieder stimmen bis auf einen konstanten Faktor mit den gleichzeitigen wechselseitigen Kohärenzfunktionen  $\Gamma_{mp,np}(\tau = 0)$  (siehe Gleichung (2.9)) überein.

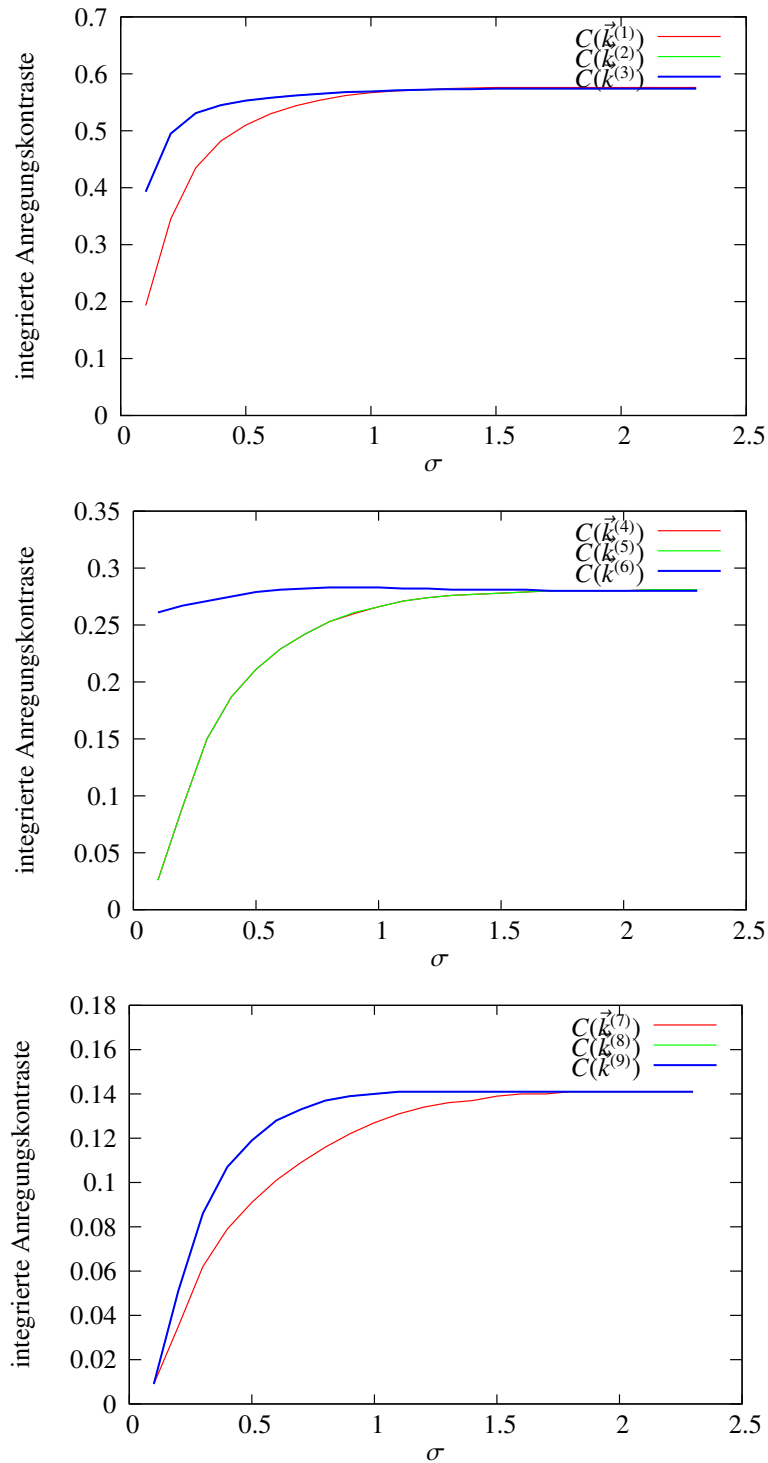
Die Bildintensität bei Abbildung eines periodischen Musters lässt sich also immer in einen inkohärenten und einen auf Interferenz beruhenden kohärenten Anteil zerlegen. Tatsächlich werden die in der SIM verwendeten Transmissionsmuster keine einzelnen Lichtpunkte erzeugen, sondern enthalten transmittierende und nicht-transmittierende Bereiche, wobei jeder Punkt der transmittierenden Bereiche als Lichtquelle interpretiert werden kann. Bei den Phasenmustern kann jeder Punkt des Musters als Lichtquelle aufgefasst werden, wobei die durch das Muster verursachte Modulation der optischen Weglängenunterschiede berücksichtigt werden muss.

Sowohl bei den Transmissions- als auch Phasenmustern kann man die Bildintensität in eine Summe aus kohärenten und inkohärenten Anteil zerlegen. Bzgl. der Anregung bei der strukturierten Beleuchtung kann man drei Fälle unterscheiden

- Bei Verwendung eines Transmissionsmusters mit inkohärentem Licht, enthält die Bildintensität nur den inkohärenten Anteil.
- Bei Verwendung eines Transmissionsmusters mit kohärentem Licht, enthält die Bildintensität sowohl den inkohärenten als auch den kohärenten Anteil, beide Anteile tragen zur Intensitätsmodulation bei.
- Bei Verwendung eines Phasenmusters mit kohärentem Licht, trägt nur der kohärente Anteil zur Intensitätsmodulation im Bild bei. Der inkohärente Anteil entspricht der konstanten Intensität, die man bei inkohärenter Abbildung des Phasenmusters erhalten hätte.

#### 4.5.2. Minimale Breite der Anregungslinie

In den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen zur Auflösungssteigerung mit spaltkonfokaler SIM, wird eine Anregungs-Laser-Linie über ein Phasenmuster bewegt, wodurch eine modulierte Anregungslinie in der Probe entsteht. Die über die Bewegung der Linie aufintegrierte Anregungsintensität ergibt dann die effektive Anregung für ein SIM Phasenbild.



**Abb. 4.7.:** Kontraste der integrierten Anregungsintensität als Funktion der Linienbreite  $\sigma$ , welche in Einheiten der Hexagonperiode  $p$  gemessen wird. Eine minimale Linienbreite von etwa  $\sigma \approx 1.6p$  ergibt eine homogene und richtungsunabhängige Verteilung der Anregungskontraste  $C(\vec{k}^{(n)})$ . Aus Symmetriegründen stimmen die Kontraste von  $\vec{k}^{(2)}, \vec{k}^{(3)}$ , sowie von  $\vec{k}^{(4)}, \vec{k}^{(5)}$ , und von  $\vec{k}^{(8)}, \vec{k}^{(9)}$  jeweils überein.

Wie in Abschnitt 4.5.1 erläutert, kommt bei der Verwendung eines Phasenmusters für die SIM jeglicher Kontrast in der Anregungslinie durch Interferenz zustande. Das bedeutet, dass die Anregungslinie eine minimale Breite aufweisen muss, damit die in der Probe einfallenden Wellen in allen Richtungen der ( $x/y$ )-Ebene interferieren können und in der integrierten Intensität einen möglichst richtungsunabhängigen Anregungskontrast erzeugen.

Zur Bestimmung der minimal notwendigen Breite der Anregungslinie wurde zur Beschreibung der Linie eine Gauss-Verteilungsfunktion angenommen:

$$I_{\text{LASER}} = I_{\text{max}} \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{(y - y_l)}{\sigma} \right)^2 \right] = I_{\text{max}} \exp \left( -4 \ln(2) \frac{(y - y_l)^2}{d_{1/2}^2} \right) ,$$

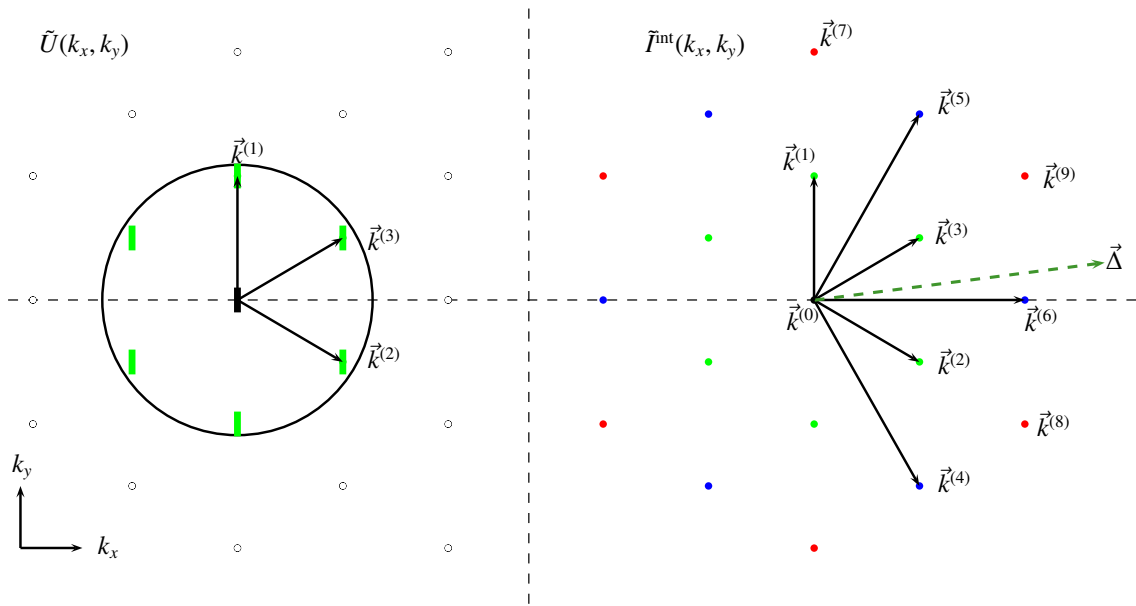
$I_{\text{max}}$  ist die maximale Intensität der Linie,  $y_l$  die Scanposition der Linie und  $d_{1/2}$  die volle Halbwertsbreite der Anregungslinie in  $y$ -Richtung ( $d_{1/2} = 2\sigma \sqrt{2 \ln(2)}$ ).

Die Kontraste der über die Scanbewegung der Linie aufintegrierten Anregungsintensitäten für  $\vec{k}^{(1)}$ ,  $\vec{k}^{(2)}$  und  $\vec{k}^{(3)}$  sind in Abbildung 4.7a) als Funktion der Linienbreite  $\sigma$  gezeigt. Die Breite der Anregungslinie  $\sigma$  wird hier in Einheiten der Hexagon-Periode  $p$  gemessen. Man beachte, dass die Kontraste von  $\vec{k}^{(2)}$  und  $\vec{k}^{(3)}$  aus Symmetriegründen den gleichen Verlauf haben.

Die entsprechenden Kontraste für die Frequenzen  $\vec{k}^{(4)}$ ,  $\vec{k}^{(5)}$ ,  $\vec{k}^{(6)}$  und  $\vec{k}^{(7)}$ ,  $\vec{k}^{(8)}$ ,  $\vec{k}^{(9)}$  sind in den Abbildungen 4.7b) und c) gezeigt.

Aus Abbildung 4.7 sieht man, dass eine minimale Breite der Anregungslinie von etwa  $\sigma \approx 1,6p$  eine homogene und richtungsunabhängige Verteilung der Kontraste der integrierten Anregungsintensität ergibt.

Falls das SIM-Phasenmuster so gefertigt ist, dass alle ersten Beugungsordnungen dieselbe Intensität haben wie die nullte Beugungsordnung, ist der theoretisch maximal erreichbare Anregungskontrast einer Frequenz gegeben durch das Verhältnis aus der Zahl der Amplitudendifferenzen die zu diesem Kontrast führt und der Gesamtzahl der Beugungsordnungen. Siehe hierzu z.B. Abbildung 4.5: Vier Differenzvektoren in der Amplitude  $\tilde{U}(k_x, k_y)$  (eingezeichnet als gelbe und grüne Pfeile) führen in der Intensität  $\tilde{I}(k_x, k_y)$  zur Frequenz  $\vec{k}^{(1)}$ , während insgesamt 7 Beugungsordnungen interferieren. D.h. der theoretisch maximal mögliche Anregungskontrast für  $\vec{k}^{(1)}$ ,  $\vec{k}^{(2)}$  und  $\vec{k}^{(3)}$  ist gerade  $4/7 \approx 0,57$ . Für die Frequenzen  $\vec{k}^{(4)}$ ,  $\vec{k}^{(5)}$ ,  $\vec{k}^{(6)}$  ist der maximal mögliche Kontrast  $2/7 \approx 0,29$  und für  $\vec{k}^{(7)}$ ,  $\vec{k}^{(8)}$ ,  $\vec{k}^{(9)}$   $1/7 \approx 0,14$ .

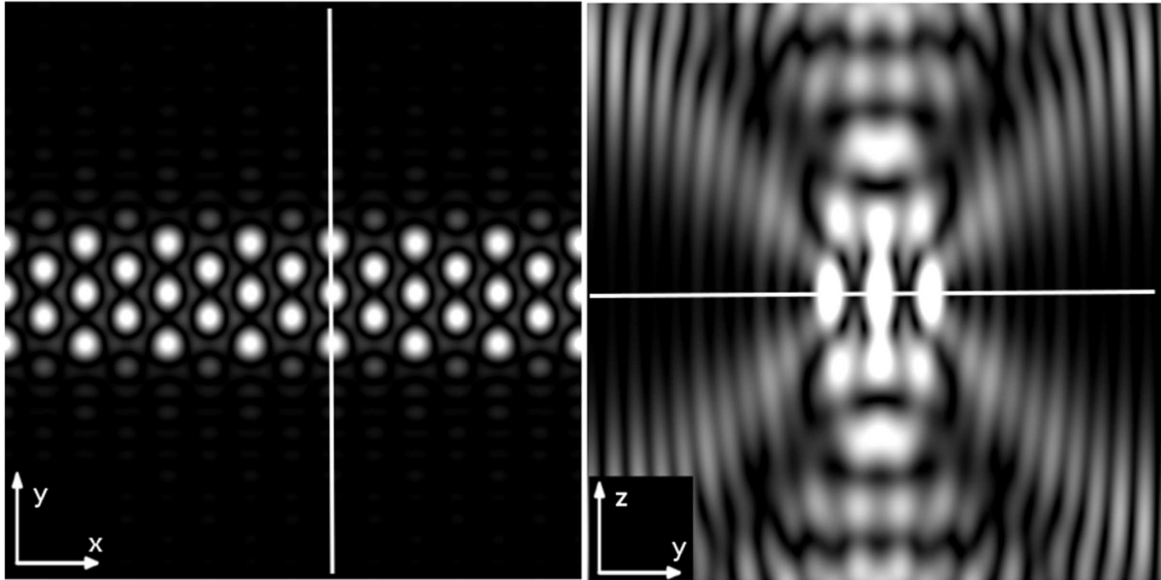


**Abb. 4.8.:** Hexagonale Frequenzordnungen im linienkonfokalen Mikroskop. Links: Amplitude der Anregung  $\tilde{U}(k_x, k_y)$  in der Pupille des Mikroskopobjektivs (eingezeichnet als Kreis). Die 6 ersten und die nullte Beugungsordnung können die Objektivpupille passieren. Durch die linienförmige Anregung sind die Beugungsordnungen in  $y$ -Richtung verbreitert. Rechts: Das Frequenzspektrum der Intensität  $\tilde{I}^{int}$  mit dem Vektor der Verschiebung  $\vec{\Delta}$ .

### 4.5.3. Konfokalität bei hexagonaler linienkonfokaler SIM

Da der Kontrast der Anregungsintensität bei Verwendung eines Phasenmusters ausschließlich durch die Interferenz der Beugungsordnungen zustande kommt, muss die Anregungslinie wie im vorherigen Abschnitt 4.5.2 beschrieben eine minimale Breite aufweisen, um in der integrierten Intensität  $\tilde{I}^{int}(\vec{k})$  eine homogene Verteilung der Anregungskontraste zu erhalten.

Eine andere Möglichkeit die Situation zu beschreiben ergibt sich bei Betrachtung der Anregungsamplitude  $\tilde{U}(k_x, k_y)$  wie in Abbildung 4.8 links gezeigt: Durch die linienförmige Beleuchtung werden die hexagonalen Beugungsordnungen in der Richtung senkrecht zur Linie (also in  $y$ -Richtung) verbreitert. Dadurch werden von den Beugungsordnungen in den 3 Richtungen unterschiedliche Anteile durch die Pupille transmittieren, wenn die Linie zu schmal gewählt ist. Dies führt in der integrierten Intensität  $\tilde{I}^{int}(\vec{k})$  rechts in Abbildung 4.8 gezeigt zu richtungsabhängigen Kontrasten. Der Effekt wird stärker, je schmaler die Linie gewählt wird. Andererseits hängt die Konfokalität in einem linienkonfokalen Mikroskop (siehe Abschnitt C.2) von der Breite der Anregungslinie und der Breite des Detektionsspalt ab. Anders als bei der Anregungslinie kann die Breite des Detektionsspalt, die bei der verwendeten Rolling Shutter Kamera die Belichtungszeit festlegt, im Prinzip beliebig klein gewählt werden.



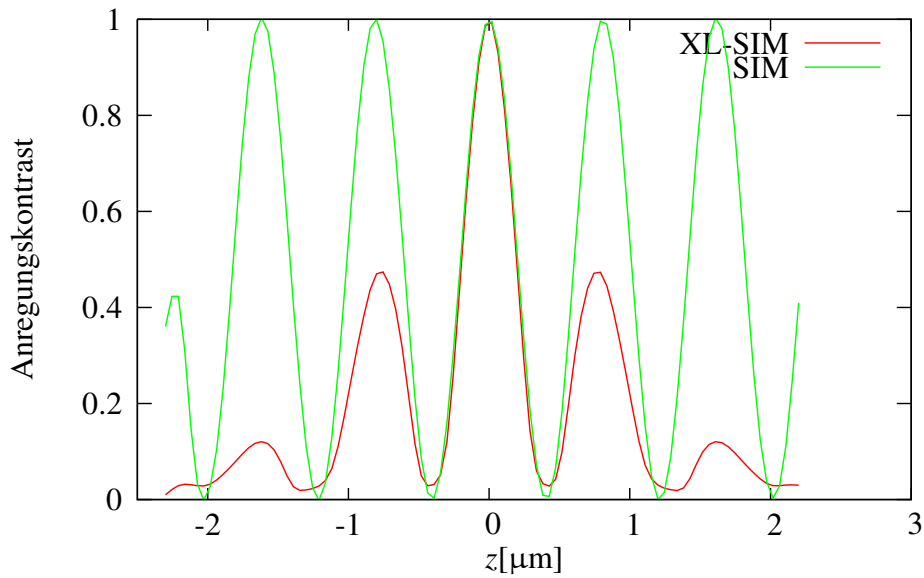
**Abb. 4.9.:** Die hexagonale Anregungslinie. Links: (x/y)-Schnitt der Anregungslinie. Rechts: entsprechender (y/z)-Schnitt. Die weißen Linien stimmen miteinander überein.

Die Konfokalität einer linienkonfokalen SIM hängt vom Verlauf der Anregungskontraste der integrierten Intensität  $\tilde{I}^{\text{int}}$  als Funktion von  $z$  ab. Im Fall einer flächigen Beleuchtung, wird (siehe Abschnitt 2.4.5) das hexagonale SIM Muster aufgrund des Talbot-Effekts in mehreren Ebenen entstehen. Die Zahl der Talbot-Ebenen wird durch die räumliche Kohärenz des Anregungslasers beschränkt [Gus08]. Im Gegensatz zum Linienmuster, liegen die lokalen Maxima der Talbot Ebenen genau an denselben Positionen wie in der Haupt-Fokus-Ebene.

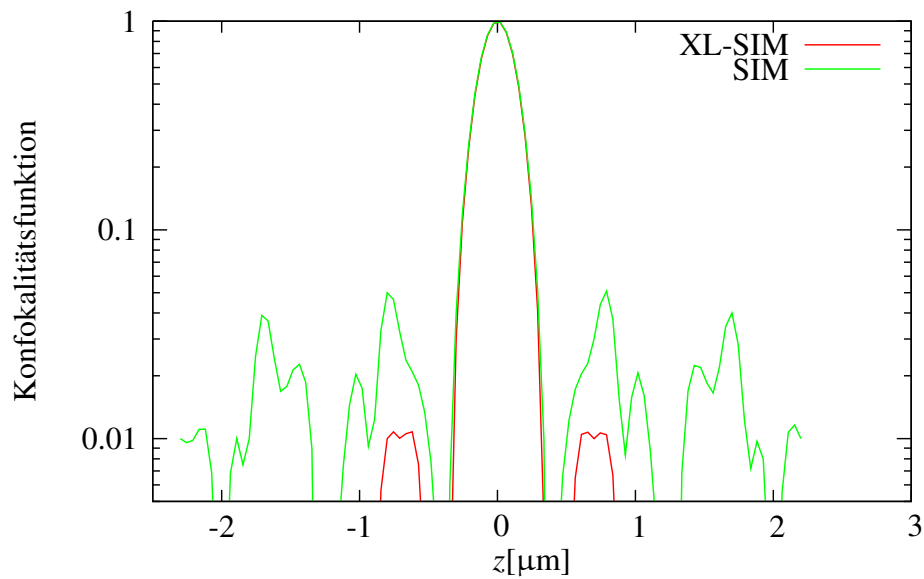
Wie in Abbildung 4.9 gezeigt, führt der Symmetriebruch durch die linienförmige Beleuchtung dazu, dass die lokalen Intensitätsmaxima des Musters in den defokussierten (Talbot-) Ebenen zum Zentrum der Linie hin verschoben werden. D.h. die Lage der lokalen Intensitätsmaxima hängen in den Talbot Ebenen (nicht in der Haupt-Fokus-Ebene) von der Position der Linie ab. Wird die Linie über das Mustersubstrat bewegt, so führt das in diesen Ebenen daher zu sich bewegenden Intensitätsmaxima. Als Folge daraus führt das in der integrierten Intensität  $\tilde{I}^{\text{int}}(\vec{k})$  zu einem reduzierten Musterkontrast in den Talbot-Ebenen und daher zu einer verbesserten Konfokalität und  $z$ -Auflösung im Vergleich zu flächiger SIM.

Dies ist in Abbildung 4.10 illustriert, welche simulierte Anregungskontraste und Konfokalitätsfunktionen für flächige und hexagonale linienkonfokale SIM zeigt. Für die Wellenlänge in der Simulation wurde  $\lambda = 488\text{nm}$  gewählt und für das Objektiv ein  $63 \times \text{NA } 1,4$  Ölimmer-





(a) Anregungskontraste für XL-SIM und SIM als Funktion von  $z$ .



(b) Konfokalitätsfunktion für XL-SIM und SIM.

**Abb. 4.10.:** Konfokalität bei hexagonaler linienkonfokaler SIM. (a) Simulierter Anregungskontrast als Funktion von  $z$  für hexagonale linienkonfokale SIM (XL-SIM) und klassischer flächige SIM. (b) Entsprechende Konfokalitätsfunktionen in logarithmischer Darstellung.

#### 4. *Strukturierte Beleuchtung mit zweidimensionalen Mustern*

---

sionobjektiv. Für die Breite des Dektektions-Spaltes (Rolling-Shutter) wurden 2 Hexagon-Perioden eingestellt.

## 5. Messungen – Quasikonfokale SIM

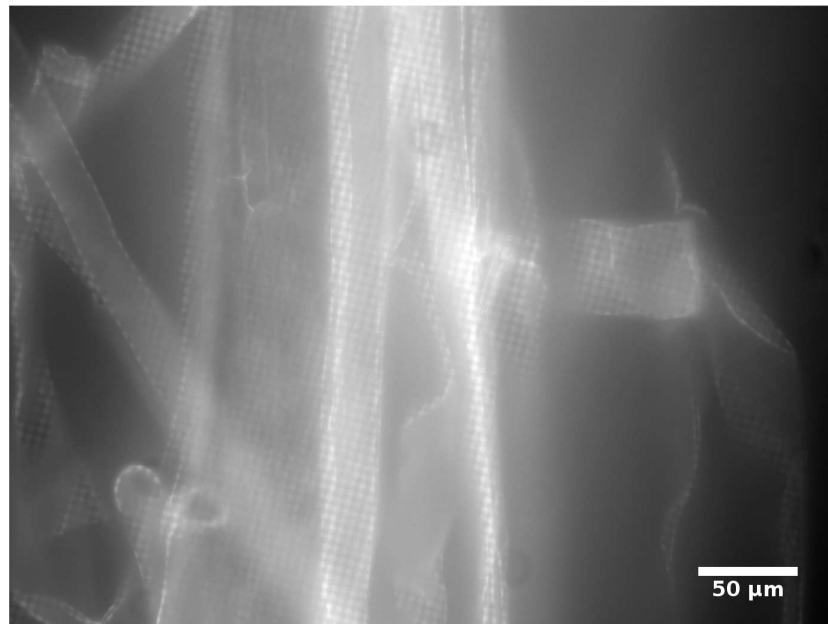
In diesem Kapitel werden die durchgeführten Messungen zur quasikonfokalen SIM beschrieben und ihre Ergebnisse behandelt. Da bei quasikonfokaler SIM mit Schachbrettmuster einerseits schlechteres SNR (vgl. Abschnitt 4.3.1) und andererseits größere Richtungsabhängigkeit (vgl. Abschnitt 4.2.2) als bei Verwendung hexagonaler Muster zu erwarten ist, beschränken sich die Messungen mit Schachbrettmuster auf einen qualitativen Machbarkeitstest. Bei hexagonaler SIM wurde zusätzlich die Richtungsabhängigkeit des quasikonfokalen Signals und die Konfokalität untersucht. In sämtlichen Messungen in diesem Abschnitt wurde eine inkohärente Lichtquelle, der *Polychrome V monochromator* und die *iMic*-Mikroskopplattform der Firma *TILL Photonics* verwendet.

### 5.1. SIM mit Schachbrettmuster

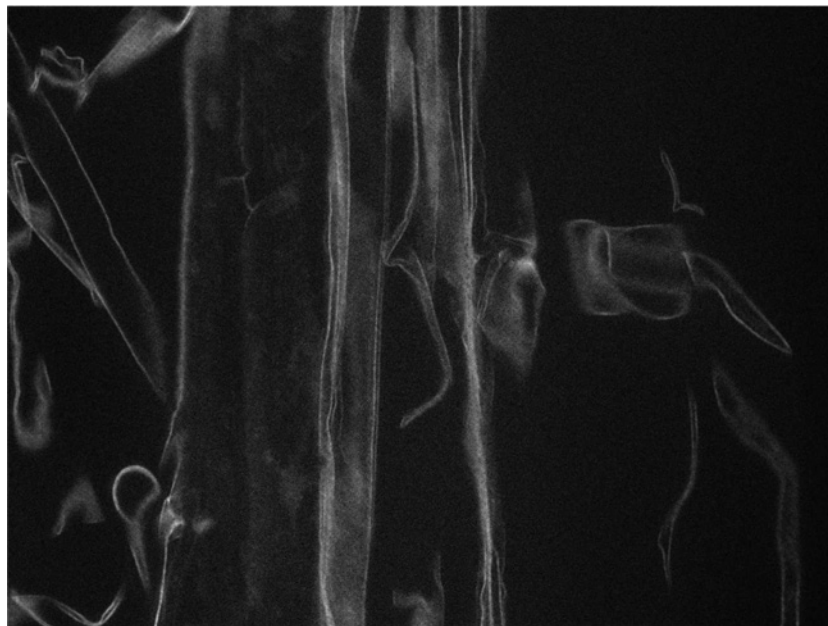
Abbildung 5.1(a) zeigt ein einzelnes von insgesamt 5 Phasenbildern, 5.1(b) zeigt ein gemäß (4.24) berechnetes quasikonfokales Bild. Die Periode des Musters in der Probe betrug etwa  $5\mu\text{m}$ , die Wellenlänge des Anregungslichtes in etwa  $\lambda = 488\text{nm}$ . Das Bild des Phasenmusters wurde durch einen galvanometrischen Scanspiegel, der sich im Strahlengang zwischen Mustersubstrat und der Anregungstubuslinse befand in der Probe verschoben. Zur Kalibration der Verschiebungen wurde eine dünne Farbstoffschicht verwendet.

### 5.2. SIM mit Hexagonmuster

Für einen qualitativen Test der Machbarkeit von quasikonfokaler SIM mit hexagonalen Mustern, wurde ein  $60 \times NA1,45$  Ölimmersionsobjektiv und eine Anregungswellenlänge von



(a) Eins von insgesamt 5 gemessenen Rohbildern mit dem auf die Probe abgebildeten Schachbrettmuster.



(b) Quasikonfokales SIM Bild, berechnet mit Gleichung (4.24)

**Abb. 5.1.:** Vergleich zwischen einem einzelnen Phasenbild in (a) und einem quasikonfokalem Bild in (b). Man kann sehen, dass die berechneten Intensitätswerte in (b) dem Kontrast des Schachbrettmusters in (a) entsprechen. Die benutzte Probe ist eine Löwenzahnwurzel. Das verwendete Objektiv war ein  $20\times$  NA 0,7 Wasserimmersionsobjektiv von der Firma Olympus (UAPO 20XW3/340).

$\lambda = 491\text{nm}$  verwendet. Abbildung 5.2 zeigt sowohl eines von 7 Rohbildern als auch ein ausgewertetes SIM Bild. Die Periode des Hexagonmusters in der Probe betrug bei dieser Messung etwa  $p \approx 400\text{nm}$ , was bei dem verwendeten Objektiv einer normalisierten Musterfrequenz von  $\nu \approx 1$  entspricht. Auch hier kann man sehen, dass der lokale Kontrast des Hexagonmusters auf der Probe in (a) mit dem ausgewerteten SIM Signal in (b) übereinstimmt.

Zusätzlich kann man qualitativ an Abbildung 5.2 einen für SIM typischen Effekt erkennen: An den Bereichen des Bildfeldes, an dem viel unmoduliertes (d.h. Ausserfokus-) Signal gemessen wurde (z.B. oben links bis zur Mitte oder unten), bleibt im SIM Bild das Rauschen des Gesamtsignals übrig (vgl. dazu z.B. Gleichung (E.8)).

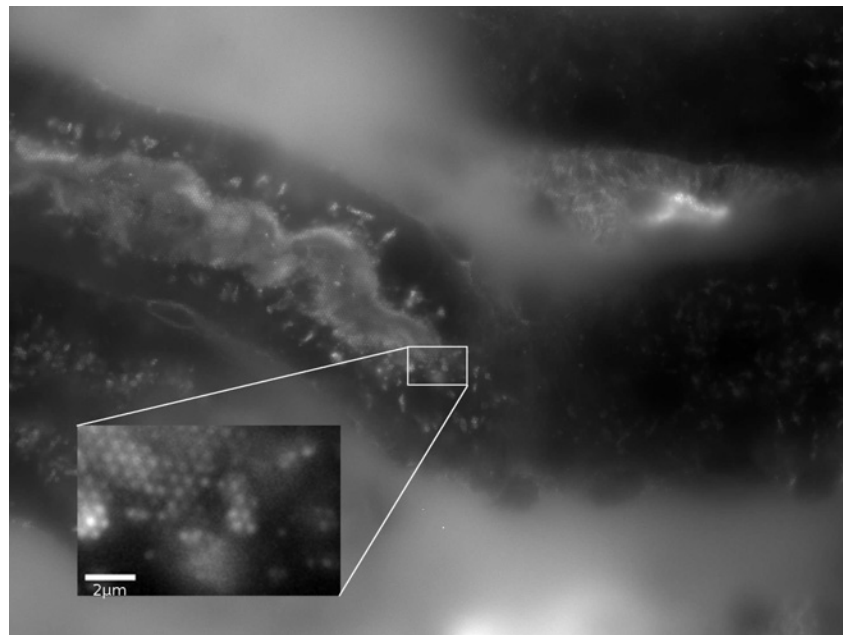
### 5.2.1. Richtungsabhängigkeit des quasikonfokalen Signals

Abbildung 5.3 zeigt den Vergleich eines quasikonfokalen mikroskopischen SIM Bildes mit Liniengitter und Hexagonmuster. Für die Aufnahmen wurde ein  $10\times\text{NA } 0,3$  Luftimmersionsobjektiv an der iMic Plattform der Firma *Till Photonics* verwendet. Bei der verwendeten Probe handelt es sich um Maiglöckchenzellen (*convallaria majalis* L.). Der Vergleich zeigt deutlich, dass die Frequenzanteile des Objekts in Übereinstimmung mit der theoretischen Erwartung (vgl. Abschnitt 4.2.2) bei hexagonaler SIM weit weniger richtungsabhängig in das ausgewertete SIM Bild eingehen. Die Vorzugsrichtung in Abbildung 5.3(a) entspricht gerade der Frequenzrichtung des verwendeten Liniengitters.

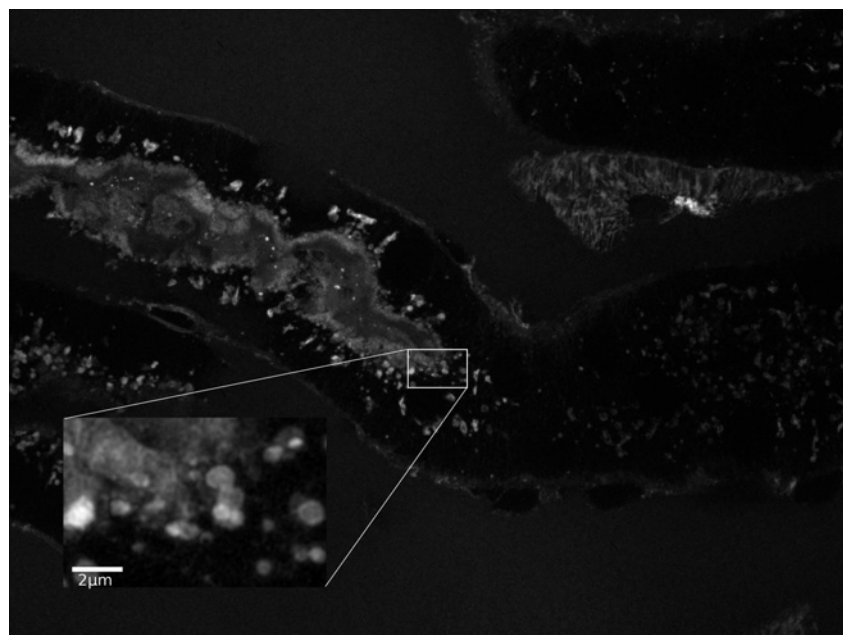
### 5.2.2. Messung der Konfokalitätsfunktion

Wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben, kann die Konfokalitätsfunktion am einfachsten vermessen werden, indem man einen  $z$ -Stapel durch eine möglichst dünne, homogen fluoreszierende Farbstoffschicht aufnimmt.

Die verwendeten Farbstoffschichten wurden hierbei durch Schleuderbeschichtung hergestellt: 2 ml 1% PMMA in  $\text{CHCl}_3$  wurden mit  $40\mu\text{l } 10^{-6}\text{mol/l}$  Perylen-Diimid-Lösung in  $\text{CHCl}_3$  vermischt. Ein einzelner Tropfen von etwa  $8\mu\text{L}$  wurde auf ein sich mit 2000 rpm drehendes Deckglas (Zeiss #1.5) aufgebracht. Die Probe wurde anschließend mit UV-Kleber NOA63

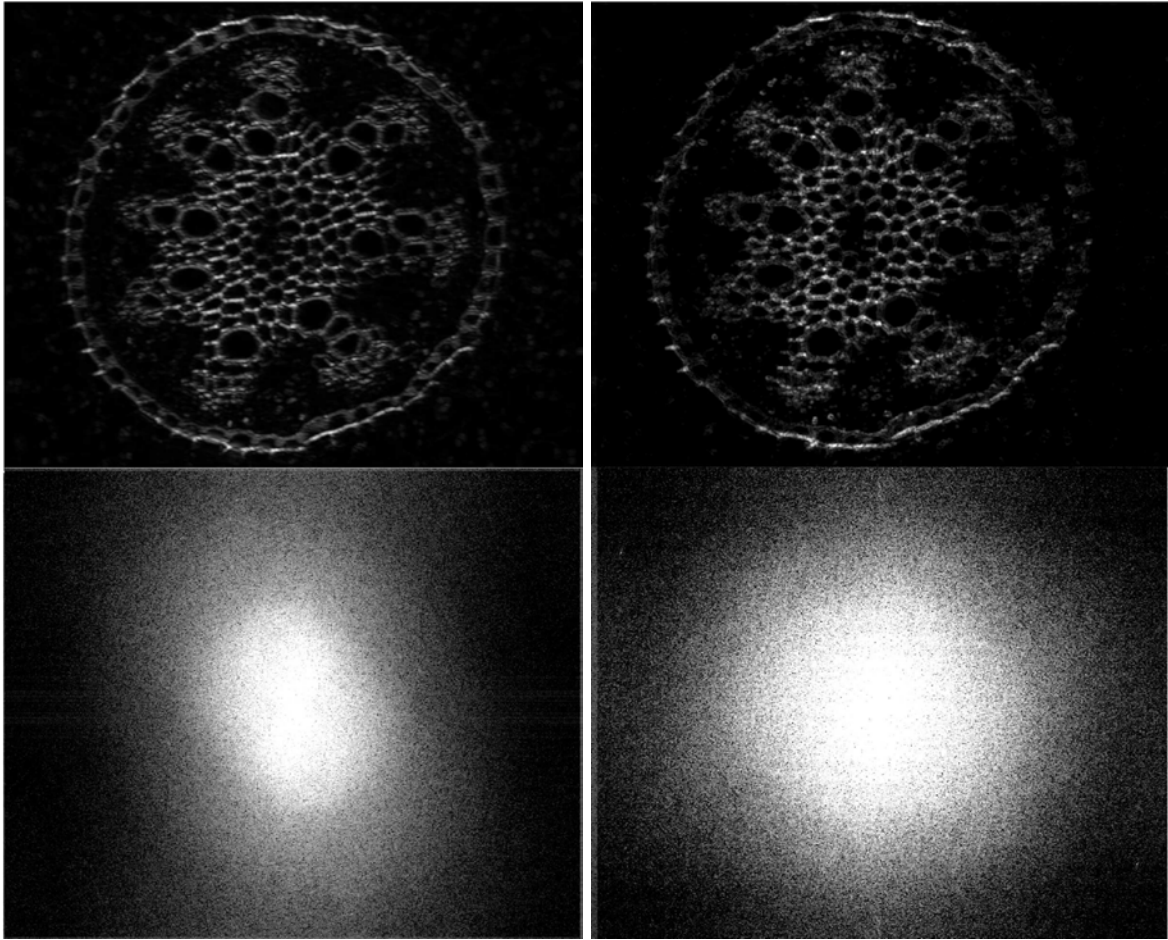


(a) Eines von insgesamt 7 Phasenbildern entsprechend Gleichung (4.31). Der eingezeichnete Maßstab ist 2µm.



(b) Ausgewertetes SIM Bild, welches als Mittel von  $I_s^{(1)}$ ,  $I_s^{(2)}$  und  $I_s^{(3)}$  in Gleichungen (4.41), (4.42) and (4.43) berechnet wurde.

**Abb. 5.2.:** Quasikonfokale hexagonale SIM. Die verwendete Probe ist ein *FluoCells® Prepared Slide #3* der Firma *Invitrogen*. Das verwendete Objektiv ist ein 60 × NA 1,45 Ölimmersionsobjektiv der Firma *Olympus*. Die Hexagonperiode  $p$  in der Probe beträgt etwa 400nm.



(a) Liniengitter SIM

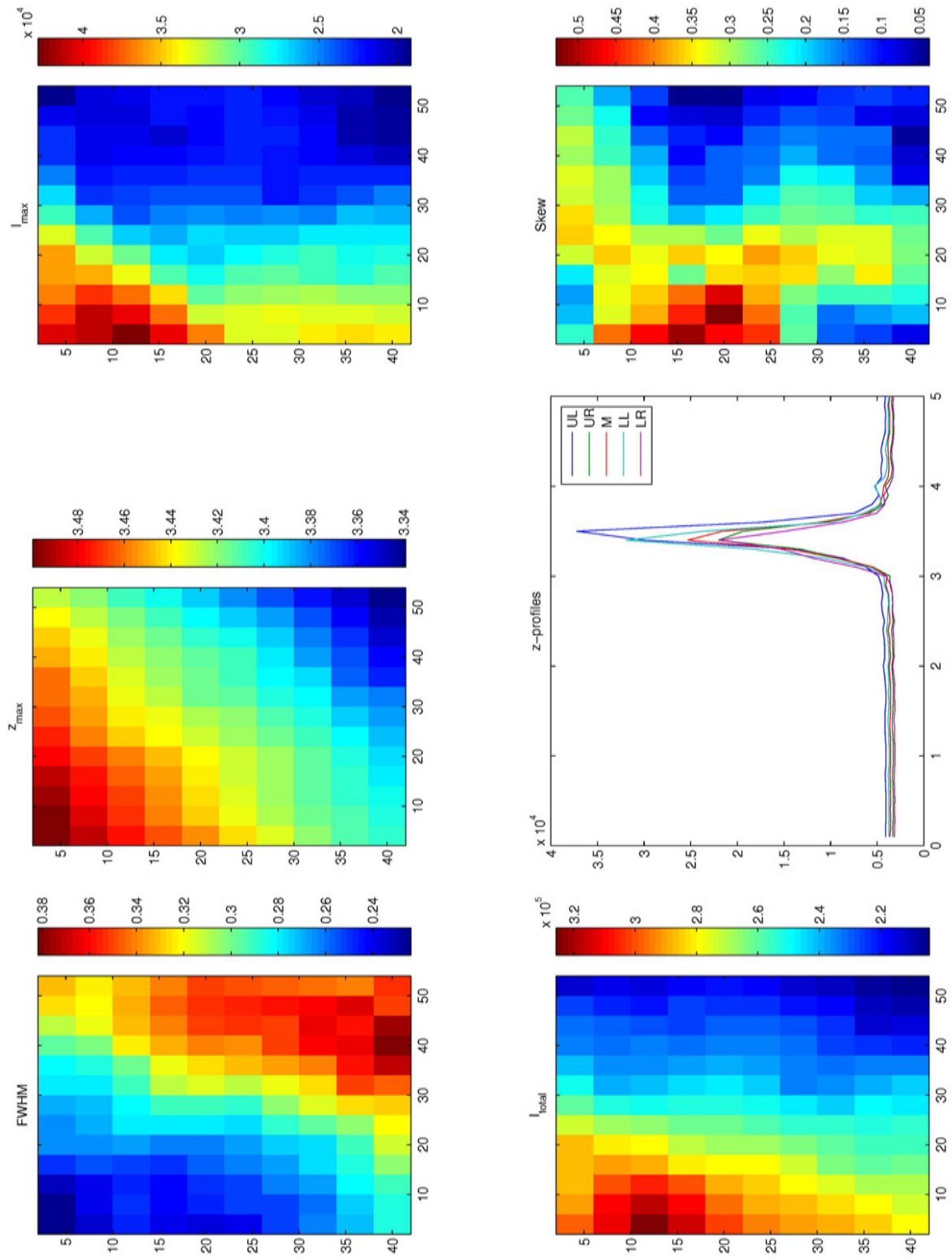
(b) Hexagonmuster SIM

**Abb. 5.3.:** Vergleich der quasikonfokalen Bilder und der Absolutbeträge ihrer Fouriertransformierten.

am Objektträger versiegelt.

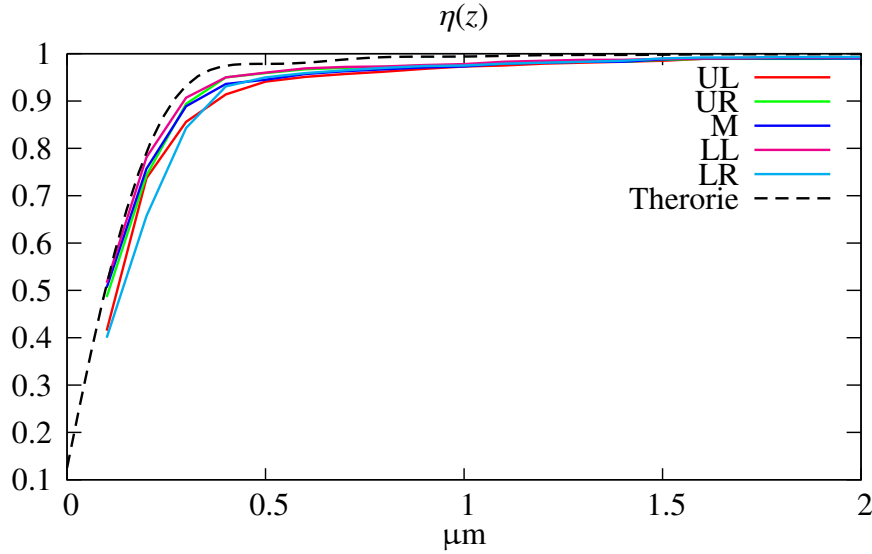
Wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben, stimmt das Intensitätsprofil, das man für jeden Bildpunkt  $(x, y)$  als Funktion von  $z$  erhält, mit der Konfokalitätsfunktion  $\mathcal{K}$  überein. In Abbildung 5.4 ist ein entsprechender SIP-Chart [Bra04] gezeigt: Hierbei wurde ein  $60 \times \text{NA } 1,45$  Öl-immersionsobjektiv der Firma Olympus verwendet und ein  $z$ -Stapel mit einem Abstand von  $100\text{nm}$  zwischen den Ebenen aufgenommen. Die gewonnenen Bilder werden mittels Binning verkleinert das Intensitätsprofil als Funktion von  $z$  wird für jeden Bildpunkt des verkleinerten Bildes an das Gaußsche Modell

$$I(z) = I_0 + I_{\max} \exp \left[ \frac{-4 \ln 2 (ze^{s \cdot z} - z_{\max})^2}{d_{1/2}^2} \right]$$



**Abb. 5.4.:** SIP-Chart für SIM mit hexagonalem Muster einer Periode von 400nm in der Probe und einem  $63 \times \text{NA } 1,45$  Ölimmersionsobjektiv. Die Einheiten der Feld- bzw.  $z$ -Positionen sind  $\mu\text{m}$ .





**Abb. 5.5.:** Die Funktion  $\eta(z)$  für den Bildstapel aus Abbildung 5.4.

gefittet.  $I_0$  ist der konstante Untergrund,  $I_{\max}$  die maximale Intensität,  $z_{\max}$  die  $z$ -Position der maximalen Intensität,  $d_{1/2}$  die Halbwertsbreite der Intensität und die dimensionslose Variable  $s$  der sogenannte *skew*<sup>1</sup>-Faktor, der die Asymmetrie der Intensitätsverteilung um  $z_0$  charakterisiert [Wei08]. Die Halbwertsbreite (FWHM) der Intensitätsverteilung über das Bildfeld beträgt bei dem gezeigten SIP-Chart ( $300 \pm 20, 6$ )nm.

$I_{\text{total}}$  in Abbildung 5.4 ist die über  $z$  integrierte Intensität und der Plot in der Mitte unten in Abbildung 5.4 zeigt 5 Intensitätsprofile für Bildpunkte links oben (UL), links unten (LL), rechts oben (UR), rechts unten (LR) und in der Mitte (M) des Bildfeldes. Die in [Wil11] definierte Funktion  $\eta(z)$  (vgl. Gleichung (3.5)) für den SIP-Chart aus Abbildung 5.4 ist in Abbildung 5.5 für dieselben Bildpunkte gezeigt. Zum Vergleich ist der theoretische Verlauf von  $\eta(z)$  für das verwendete Objektiv (vgl. Abb. B.1) eingezeichnet.

Insgesamt kann man sagen, dass SIM sowohl mit Schachbrett- als auch mit Hexagonmustern unter Verwendung der in Abschnitten 4.1 und 4.2 beschriebenen Verschiebewinkel funktioniert und dass die optische Transferfunktion von hexagonaler SIM deutlich weniger richtungsabhängig ist, als bei SIM mit Linienmustern. Die Konfokalität, die mit hexagonaler SIM erreicht wird, ist vergleichbar mit der Konfokalität die mit konventionellen SIM Geräten mit Liniengittern bei der verwendeten Musterfrequenz erreicht wird, wobei das S/N bei hexagonalen und Schachbrett-Mustern theoretisch ein wenig größer sein sollte. Da bei einem direkten

<sup>1</sup>von engl. skew: Schräge

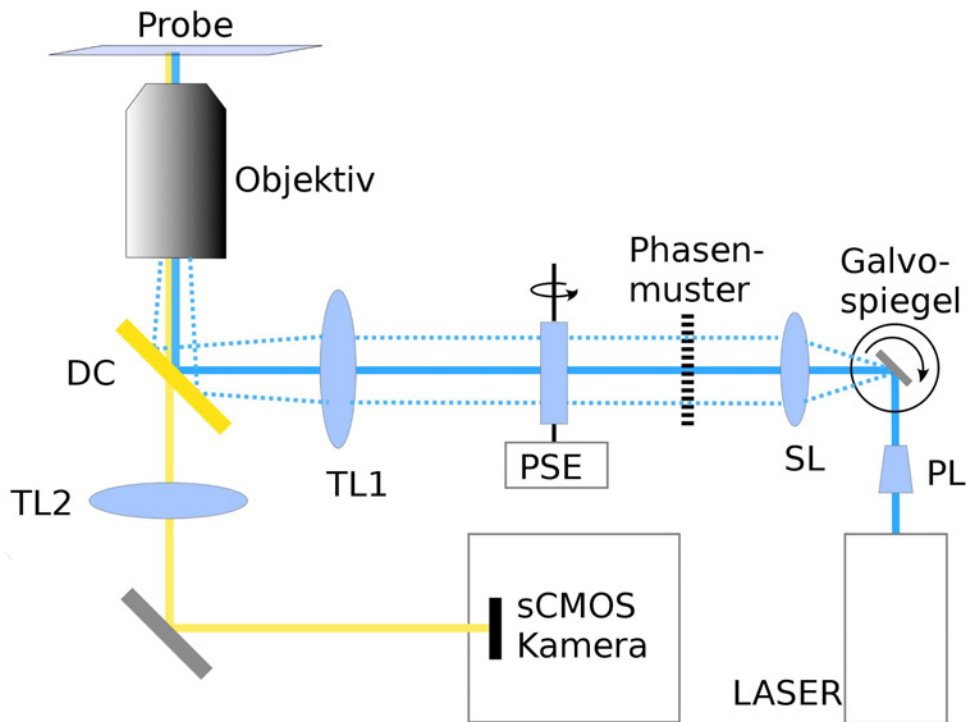
experimentellen Vergleich der SNR von Liniengitter und Hexagon SIM die gesamte in allen Phasenbildern detektierte Photonenzahl die gleiche sein sollte, müsste man aufgrund der unterschiedlichen Füllfaktoren von Liniengitter und Hexagon die Intensität der Lichtquelle bei einem Vergleich auf das jeweilige Muster anpassen. Auch dann wäre ein fairer Vergleich nicht ohne weiteres möglich, da aufgrund von Bleichen des Farbstoffs immer das Verfahren das zuerst gemessen würde einen Vorteil hätte. Aufgrund dessen wurde auf diesen direkten Vergleich verzichtet.

## 6. Messungen – Hexagonale Linienkonfokale Superresolution-SIM

Alle Messungen in diesem Kapitel wurden mit einer Prototyp-Plattform der Firma *TILL I.D.* mit einem Objektiv der Firma *Zeiss* bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 488\text{nm}$  durchgeführt. Als Lichtquelle für die Fluoreszenzanregung wurde ein *iBeam-Smart-488-S* LASER der Firma *TOPTICA*, mit einer Ausgangsleistung von 200mW benutzt.

In Abbildung 6.1 ist der Anregungs- und Detektionsstrahlengang schematisch gezeigt: Das Anregungslicht wird mit einer *Powell*-Linse (PL) der Firma LT-Ultra zu einer Linie geformt. Diese Linie wird durch den galvanometrischen Scan-Spiegel 6210H der Firma *Cambridge Technology* über das Bildfeld bewegt. Die Scan-Linse SL ( $f = 40,2\text{mm}$ , Sill Optics GmbH) fokussiert die Linie auf dem SIM Phasenmuster, welches durch die Tubuslinse TL1 (423308, Zeiss,  $f = 164,5\text{mm}$ ) und das Objektiv (Zeiss plan Apochromat 63  $\times$ NA 1.4 Öl DIC) auf die Probe abgebildet wird. Zwischen der Tubuslinse TL1 und dem Objektiv befindet sich ein dichroitischer Spiegel (DC), welcher das Licht der Anregungswellenlänge  $\lambda \approx 488\text{nm}$  reflektiert und das Licht der Emissionswellenlänge  $\lambda \approx 520\text{nm}$  reflektiert. Zwischen dem Phasenmuster und der Tubuslinse TL1 befindet sich die Phasenschiebe-Einheit PSE, bestehend aus einem 5mm dickem Glasplättchen (Thorlabs WG11050-A), welches mit einem Galvanometer (CTI 6220H) rotiert werden kann. Mit der PSE kann das SIM-Muster in der Probe bewegt werden. Die Fluoreszenz-Emission aus der Probe wird über das Objektiv und die Tubuslinse TL2 auf eine sCMOS Kamera abgebildet.

Die Galvanometer werden über eine digitale Einheit DC900 (SmartMove, Cambridge Technology) angesteuert. Die Bewegung der Anregungslinie und des Rolling Shutters der sCMOS

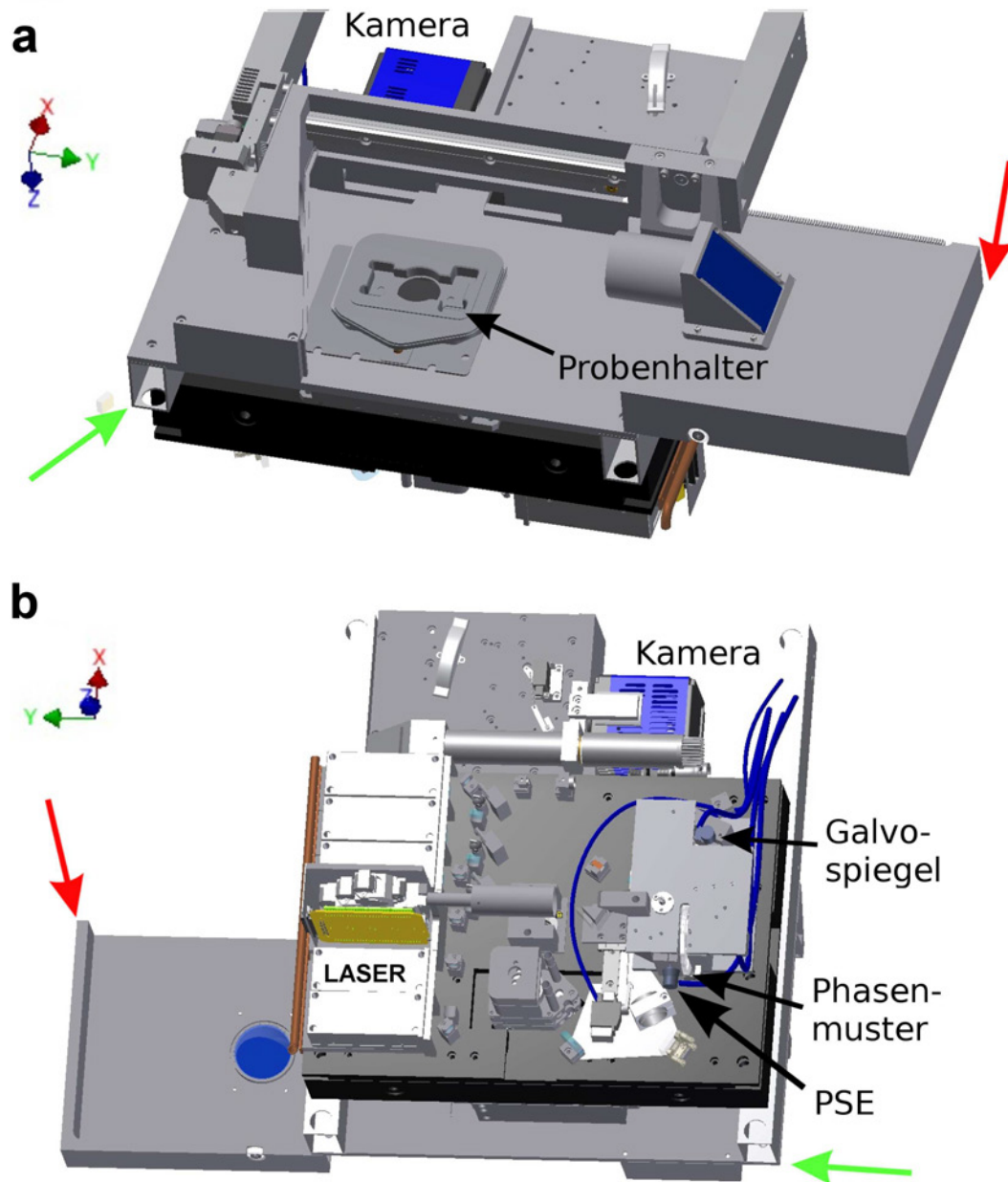


**Abb. 6.1.:** Schematischer Aufbau des Anregungs- und Emissionsstrahlenganges.

Kamera wurde ein Micro-Controller mit einem Embedded Linux System benutzt. Die Tubuslinse TL2 wurde mit Hilfe der Software *ZEMAX* gerechnet und hat eine Brennweite von etwa  $f \approx 203\text{mm}$ . Zusammen mit dem verwendeten Objektiv ergibt sich insgesamt ein Vergrößerungsfaktor von etwa  $(77 - 78)\times$ . Das Objektiv wurde in Kombination mit Immersol<sup>TM</sup> 518F/ISO8036 Immersionsöl ( $n_e = 1.518$  ( $23^\circ$ ),  $\nu_e = 45$ ) verwendet.

Abbildung 6.2 zeigt ein 3D Modell des verwendeten Mikroskop-Prototyps. Anstelle eines einzelnen dichroitischen Spiegels wie in dem Schema in Abbildung 6.1, wurde ein Filtersatz der Firma *Alluxa*, bestehend aus Anregungsfilter, dichroitischen Spiegel und Emissionsfilter benutzt. Das SIM Phasenmuster wurde wie in Anhang J beschrieben konzipiert und von der Firma *Collischon Optik-Design* aus Erlangen hergestellt. Die Musterperiode wurde so gewählt, dass sie für das verwendete Objektiv einer normalisierten Gitterfrequenz von  $\nu \approx 1$  entspricht, d.h.  $p = 400\text{nm}$ .

Durch die kohärente Anregung entstehen bei dieser Periode – wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben – insgesamt 19 Frequenzordnungen in der Anregungsintensität. Daher sind mindestens



**Abb. 6.2.:** 3D CAD Modell des verwendeten Mikroskop-Prototyps. a) Ansicht von oben. b) Ansicht von unten, welche den Anregungsstrahlengang aus Abbildung 6.1 zeigt. Die farbigen Pfeile in a) und b) markieren jeweils dieselben Gerätekanten.

$N = 19$  Phasenbilder zur Trennung aller in den Phasenbildern enthaltenen Frequenzbändern notwendig. Um die Bänder zu trennen, wird eine Verschieberichtung  $\theta \approx 6,59^\circ$  (bzw.  $\kappa = 7$ ) gewählt. Das Phasenmuster-Substrat ist auf einer rotierbaren Scheibe montiert, wodurch der Winkel zwischen Verschieberichtung und den Symmetrieachsen des Musters richtig eingestellt werden kann.

Die verwendete Kamera – eine *pco.edge 4.2* der Firma *PCO* – hat eine minimale Aufnahmezeit von 10ms und eine Pixelgröße von  $6,5\mu\text{m}$ . Durch die Synchronisation der Bewegungen des Kamera Rolling Shutters und der Anregungslinie auf dem Bildfeld, wird eine linienkonfokale Anregung und Detektion realisiert. Die Pixelgrößen in der Probe wurden durch ein Mikrometer von *Thorlabs* (R1L3S2P) bestimmt und betragen bei dem verwendeten Objektiv etwa 84nm und entspricht gut dem erwarteten Wert (83,6nm).

Normalerweise wird bei einer Rolling-Shutter Kamera mit der Breite des Shutters die Belichtungszeit, d.h. die Zeit in der ein Pixel jeweils aktiv ist, eingestellt. In den Messungen in diesem Kapitel, wird aber die Konfokalität der Detektion durch die Breite des Rolling-Shutters bestimmt und kann somit nicht zum Verändern der Belichtungszeit angepasst werden.

Die Kamera kann in zwei verschiedenen Modi betrieben werden, die unterschiedlichen Belichtungszeiten entsprechen. Im schnellen Modus entspricht z.B. eine Rolling-Shutter Breite von 10 Pixeln einer Belichtungszeit von  $100\mu\text{s}$ , im langsamen Modus einer Belichtungszeit von  $275\mu\text{s}$ . Falls man andere Belichtungszeiten benötigt, kann man das für die SIM einfach realisieren, indem mehr als die Mindestzahl  $N = 19$  an Phasenbildern aufgenommen werden.

### 6.1. Auflösungssteigerung - qualitativ

Um die Auflösungssteigerung mit hexagonaler SIM (X-SIM) qualitativ zu zeigen, wurde eine *Tubulin*-Probe benutzt, die wie in [Sme14] beschrieben präpariert wurde.

Mit der Probe wurde ein  $z$ -Stapel von jeweils 19 Phasenbildern pro Ebene aufgenommen, was einer gesamten Aufnahmezeit von etwa 190ms in jeder Ebene entspricht. Die Abstände zwischen den Ebenen betrug 100nm. Da die hier verwendete Probe relativ dünn ist (wenige  $\mu\text{m}$ ), wurde die Breite des Rolling-Shutters auf 500 Pixel eingestellt. D.h. die Phasenbilder wurden nicht-konfokal detektiert und sind damit äquivalent zu Bildern, die mit einem

Weitfeld-Anregung und Detektion aufgenommen wurden. Aufgrund der großen Dynamik der gemessenen und berechneten Bilder (etwa 10bit) wurde eine farbige Darstellung gewählt.

Die in den Phasenbildern enthaltenen Frequenzbänder wurden wie in Abschnitt 4.2 beschrieben für alle Ebenen des  $z$ -Stapels getrennt und die 3D Fouriertransformation für das gesamte Bildvolumen berechnet. Die Bänder wurden dann gemäß Gleichung (3.24) zu einem Bildvolumen mit gesteigerter Auflösung überlagert. Iterative Entfaltungsalgorithmen wie in [Aga89] beschrieben, werden heute oft in der 3D Mikroskopie benutzt [Sch08]. Diese Algorithmen ermöglichen es theoretisch die mikroskopische Auflösung zu verbessern [Car95] und werden auch für die Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung benutzt [Cha16].

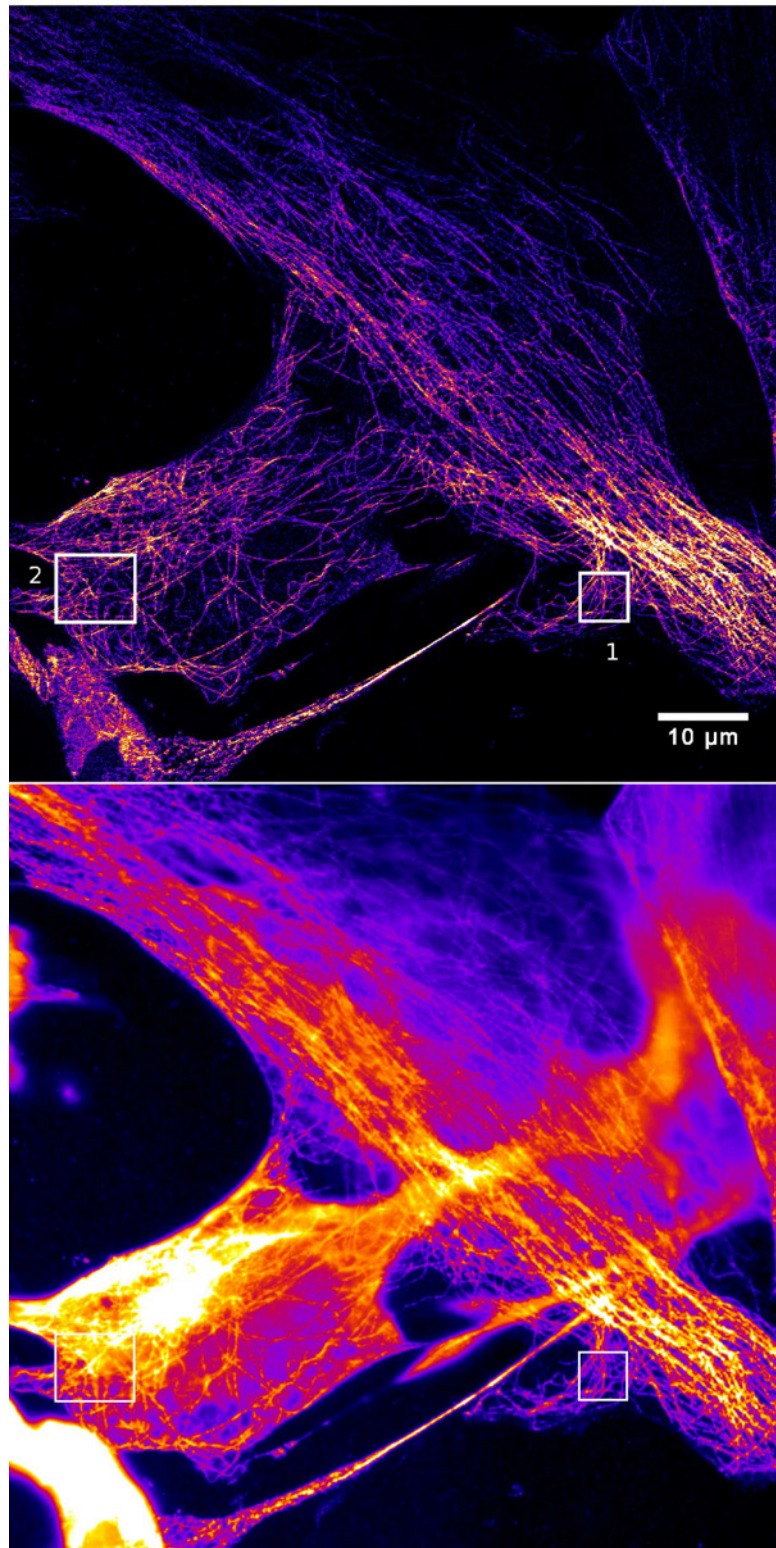
Einerseits hängen die Ergebnisse bei diesen Verfahren zum Teil stark vom zu rekonstruierenden Objekt ab, andererseits soll in dieser Arbeit nur die Auflösungssteigerung durch hexagonale linienkonfokale SIM charakterisiert werden. Aufgrund dessen wurde bei der in dieser Arbeit vorgestellten Messungen auf weitere Entfaltungsalgorithmen verzichtet und nur Gleichung (3.24) (verallgemeinert auf hexagonale Frequenzbänder) zur Berechnung der Objektfunktion  $\tilde{S}(\vec{k})$  benutzt.

Der Absolutbetrag des nullten Frequenzbandes ( $D^{(0)}(\vec{x})$ ) ergibt einen Stapel aus Bildern, die äquivalent zu weitfeldmikroskopischen Bildern sind. Ein Vergleich solcher berechneten Weitfeldbilder (WF) und hexagonaler SIM (X-SIM) mit gesteigerter Auflösung ist in Abbildung 6.3 gezeigt. Die Größe des gesamten Bildfeldes beträgt  $(84 \times 84) \mu\text{m}^2$ . Abbildung 6.4(a) zeigt vergrößerte Darstellungen der mit „1“ und „2“ markierten Bereiche aus Abbildung 6.3.

Man sieht, dass der mit „1“ markierte Bereich wenig Ausserfokus Signal enthält. In der vergrößerten Darstellung kann man im X-SIM Bild einige Details der Probe erkennen, die im WF Bild nicht mehr aufgelöst wurden (siehe z.B. die weißen Pfeile in Abbildung 6.4(a) oben). Die Intensitätsprofile entlang den weißen horizontalen Linien in Abbildung 6.4(a) oben ist in Abbildung 6.4(b) gezeigt. Zum besseren Vergleich wurde das WF Signal skaliert und eine konstante Intensität subtrahiert.

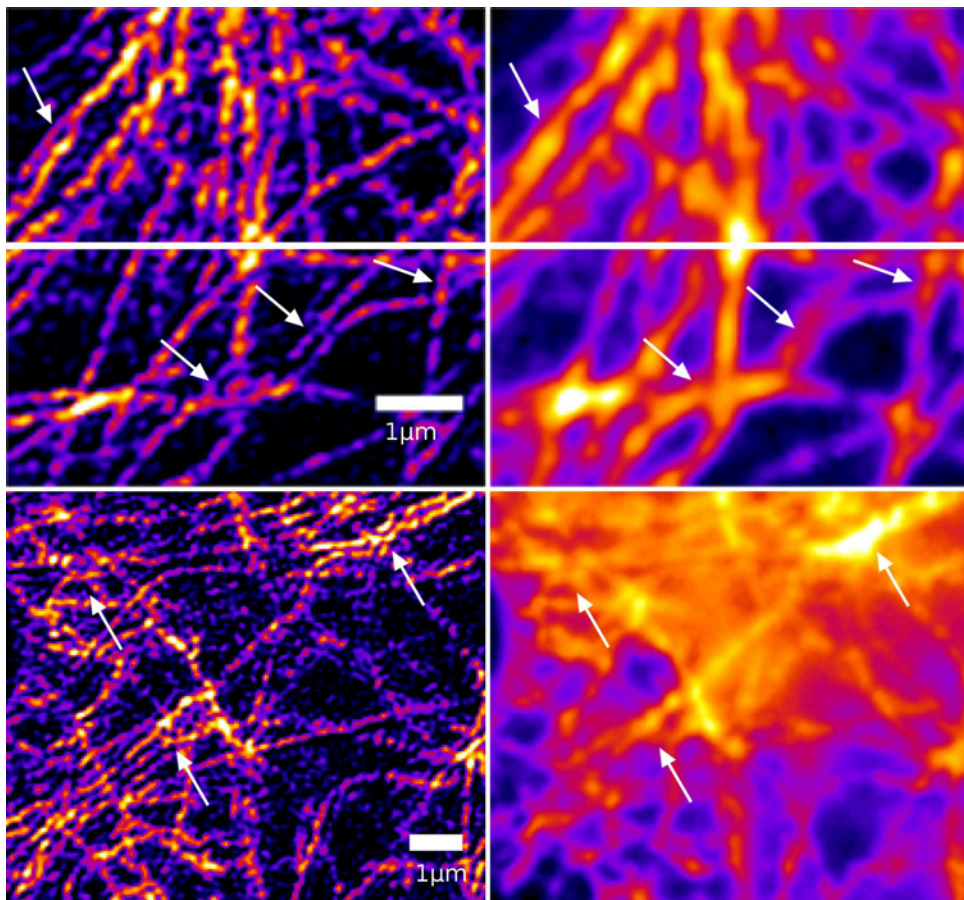
In Abbildung 6.4(a) unten ist der mit „2“ markierte Ausschnitt aus Abbildung 6.3 gezeigt. Dieser Bereich enthält deutlich mehr Ausserfokus Signal als der Bereich „1“. Dies führt einerseits zu einer Verschlechterung der Auflösung im WF Bild und zu Artefakten im X-SIM Bild.



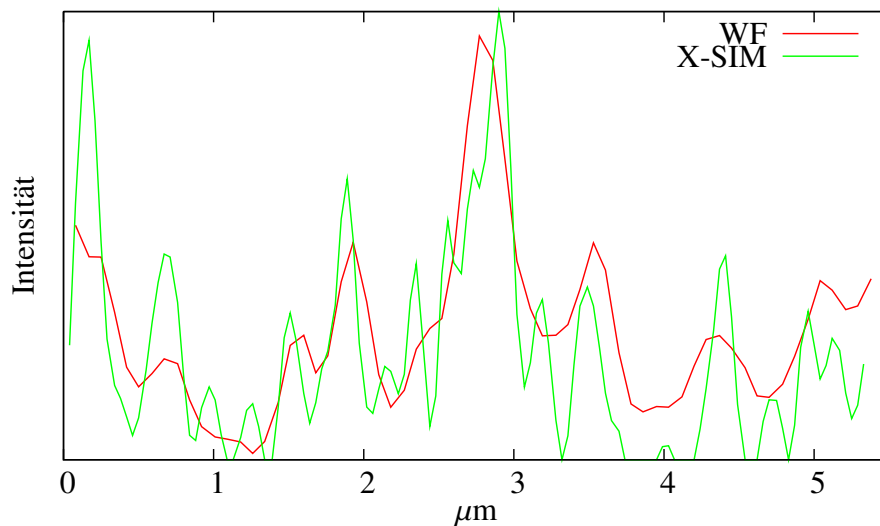


**Abb. 6.3.:** Qualitativer Vergleich zwischen hexagonaler Superresolution (oben) und Weitfeld (unten).





(a) Oben: der mit „1“ markierte Bereich. Unten: der mit „2“ markierte Bereich. Die Pfeile markieren Stellen in der Probe, die im Weitfeldbild nicht mehr aufgelöst werden, aber mit der hexagonalen SIM deutlich erkennbar sind.



(b) Intensitätsprofil entlang der weißen horizontalen Linie in (a) für Weitfeld (WF) und hexagonale SIM (X-SIM).

**Abb. 6.4.:** Vergrößerte Darstellung der in Abbildung 6.3 markierten Bereiche und Vergleich zweier Intensitätsprofile.

## 6.2. Auflösungssteigerung - quantitativ

Die Auflösungssteigerung mit hexagonaler (linienkonfokaler) SIM wurde quantitativ mit zwei unterschiedlichen Methoden untersucht:

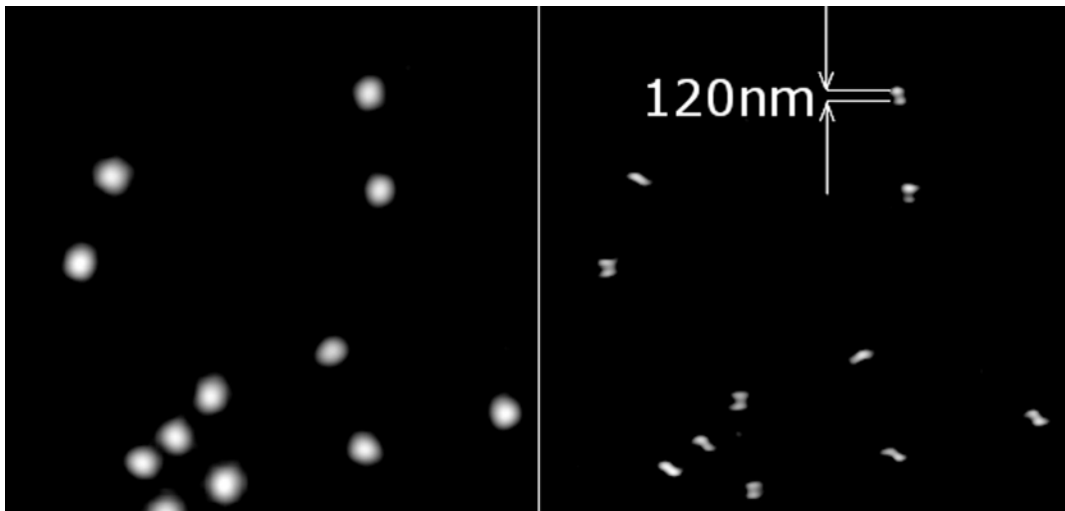
1. Mit *Nanoruler* der Firma *Gattaquant*.
2. Mit fluoreszierenden Beads<sup>1</sup> der Firma *ThermoFisher*

### 6.2.1. Nanoruler

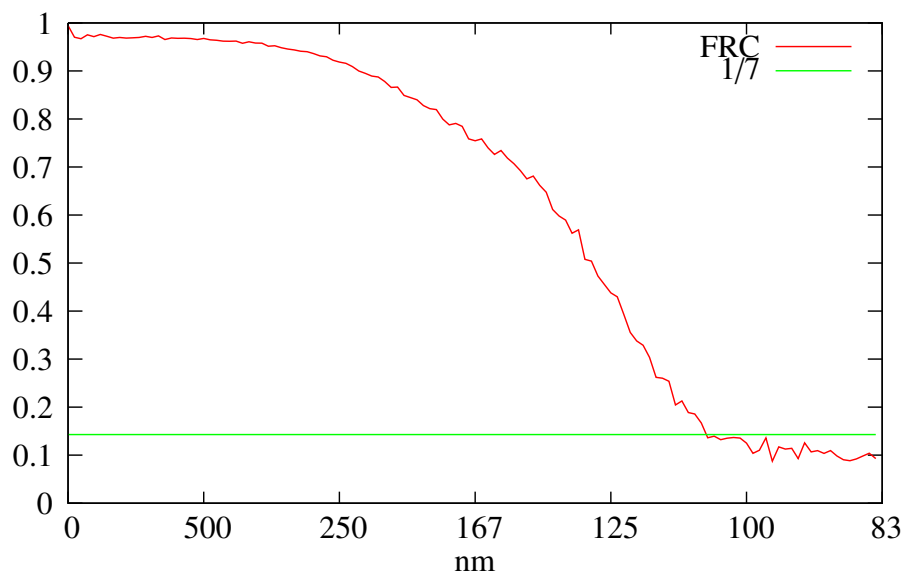
Nanoruler bestehen aus zwei (oder mehreren) Fluoreszenz-Markierungen in einem fest definiertem Abstand, welcher durch selbst-organisierende DNA-Origamis zustande kommt [Sch12]. Sie bieten zunächst eine einfache Möglichkeit die Auflösung eines Mikroskops zu überprüfen und gegebenenfalls zu optimieren. In den hier gezeigten Messungen wurden Nanoruler mit einem Abstand von 120nm verwendet.

Da die verwendete Nanoruler-Probe (GATTA-SIM 120B) sehr dünn ( $< 1\mu\text{m}$ ) ist, wurde wie im vorherigen Abschnitt der Rolling-Shutter auf eine Breite von 500 Pixeln eingestellt. Da jeder einzelne Nanoruler nur einige wenige Farbstoffmoleküle enthält, und die Probe daher verhältnismäßig schnell ausbleicht, wurde in diesem Experiment die LASER Leistung reduziert und eine Belichtungszeit von 760ms eingestellt, indem insgesamt 76 Phasenbilder in jeder  $z$ -Ebene aufgenommen wurden.

In Abbildung 6.5 ist eine Ebene des Bildstapels mit WF und X-SIM für die Nanoruler Probe gezeigt. Während die einzelnen Farbstoffkonzentrationen in dem Weitfeldbild links nicht mehr aufgelöst werden, kann man in dem X-SIM Bild deutlich die einzelnen Punkte der Nanoruler erkennen. Um eine glattere Darstellung zu erhalten, wurde in den Auswertungen zu dieser Messung ein Pixel-Interpolationsfaktor von 4 gewählt, d.h. die Abmessungen der Bildpunkte beträgt in den rekonstruierten Bildern etwa 21nm. Um das WF Bild besser mit dem X-SIM Bild vergleichen zu können, wurde dieselbe Pixelinterpolation auch auf das WF-Bild angewandt.



**Abb. 6.5.:** Bild der Nanoruler Probe. Links: Weitfeld (WF), rechts: hexagonale SIM (X-SIM).



**Abb. 6.6.:** Fourier-Ring-Correlation für das in Abbildung 6.5 gezeigte X-SIM Bild mit dem üblichen Schwellenwert von  $1/7 \approx 0,143$ . Der gemäß diesem Schwellenwert bestimmte Wert für die laterale Auflösung beträgt 106,1nm.

Um die Auflösung des X-SIM Mikroskops mit Hilfe der Nanoruler zu quantifizieren, wurde ein Konzept aus der Elektronenmikroskopie benutzt, die *Fourier-Ring-Correlation* (FRC) [Sax82]. FRC wird seit einigen Jahren auch in der optischen Mikroskopie verwendet um die Auflösung von Mikroskopen zu charakterisieren [Bui13, Nie13]. Hierbei werden für jeweils zwei mikroskopische Bilder die Fouriertransformierte berechnet. Die Ähnlichkeit der (Raum-)Frequenzspektren wird dann durch eine Korrelation innerhalb des Rings von Frequenzen verglichen:

$$\text{FRC}(|\vec{k}|) = \frac{\sum_{\vec{k}' \in \text{Ring}(|\vec{k}|)} \tilde{I}_1(\vec{k}') \cdot \tilde{I}_2^*(\vec{k}')}{\sqrt{\sum_{\vec{k}' \in \text{Ring}(|\vec{k}|)} |\tilde{I}_1(\vec{k}')|^2} \sqrt{\sum_{\vec{k}' \in \text{Ring}(|\vec{k}|)} |\tilde{I}_2(\vec{k}')|^2}}$$

Das Maximum FRC ist für die Nullfrequenz auf 1 normiert. Die Auflösung wird bei diesem Verfahren dadurch ermittelt, dass die größte Frequenz bestimmt wird, für die der Wert der FRC gerade noch oberhalb eines bestimmten Schwellenwerts liegt. In dieser Arbeit wird wie z.B. in [Nie13] ein Schwellenwert von  $1/7 \approx 0,143$  benutzt.

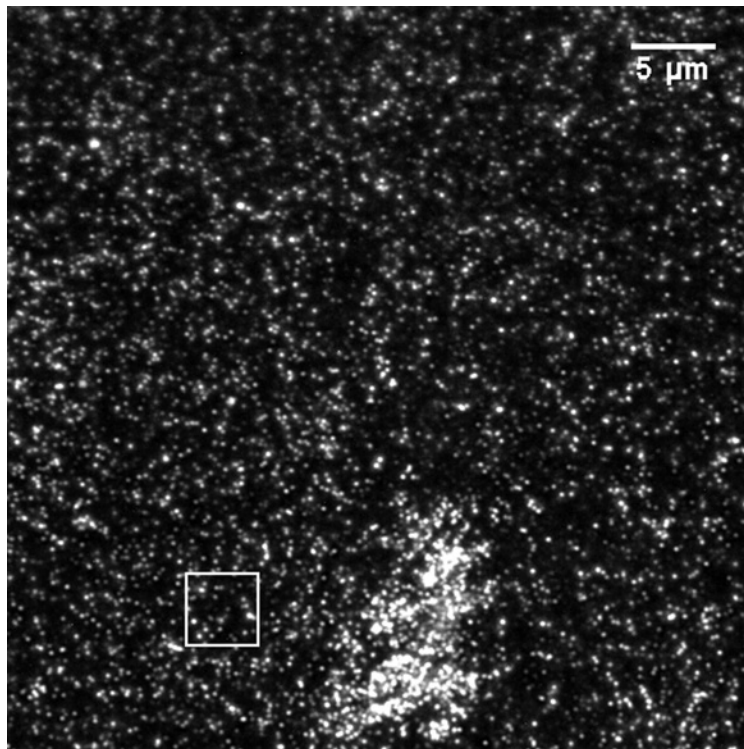
Die insgesamt 76 aufgenommenen Phasenbilder, wurden in 2 statistisch unabhängige Sätze von jeweils 38 Phasenbildern aufgeteilt. Aus diesen beiden Sätzen aus Phasenbildern, wurden je ein Superresolution X-SIM Bilder ausgewertet. Von diesen X-SIM Bildern wurde dann eine FRC berechnet. Das entsprechende Ergebnis ist in Abbildung 6.6 gezeigt: Für einen lateralen Abstand von etwa 106.1nm fällt die FRC unter den Schwellenwert von  $1/7$ . Dieser ermittelte Wert für die Auflösung stimmt gut mit der theoretischen Erwartung überein, der für eine verdoppelte Auflösung in etwa 100nm betragen sollte.

### 6.2.2. Beads

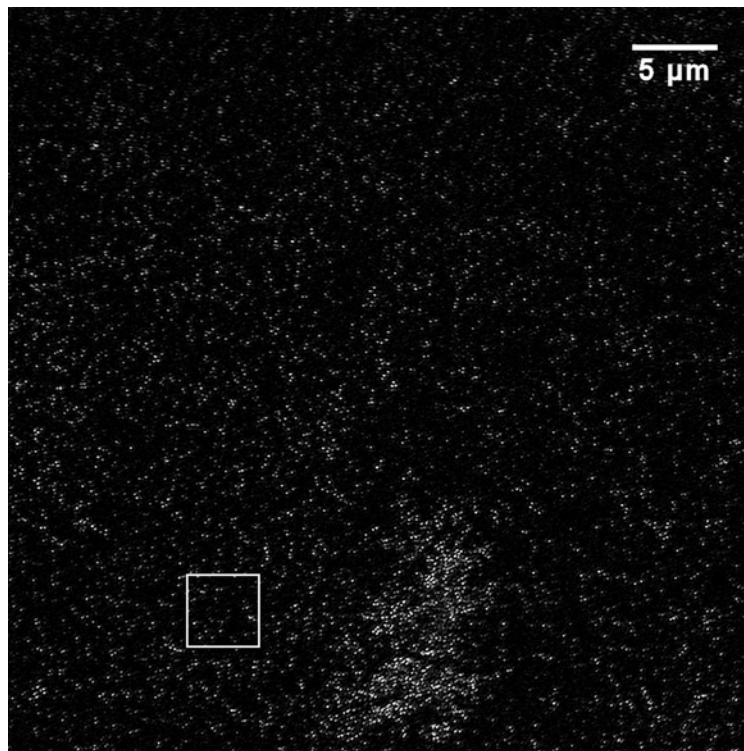
Eine andere weit verbreitete Möglichkeit die Auflösung eines Fluoreszenzmikroskops zu bestimmen ist das direkte Messen der PSF. Hierbei werden grün fluoreszierende Perlen (Beads), mit einem Durchmesser von etwa 50nm, der deutlich unterhalb der zu erwartenden Auflösung

---

<sup>1</sup>engl.: Perlen



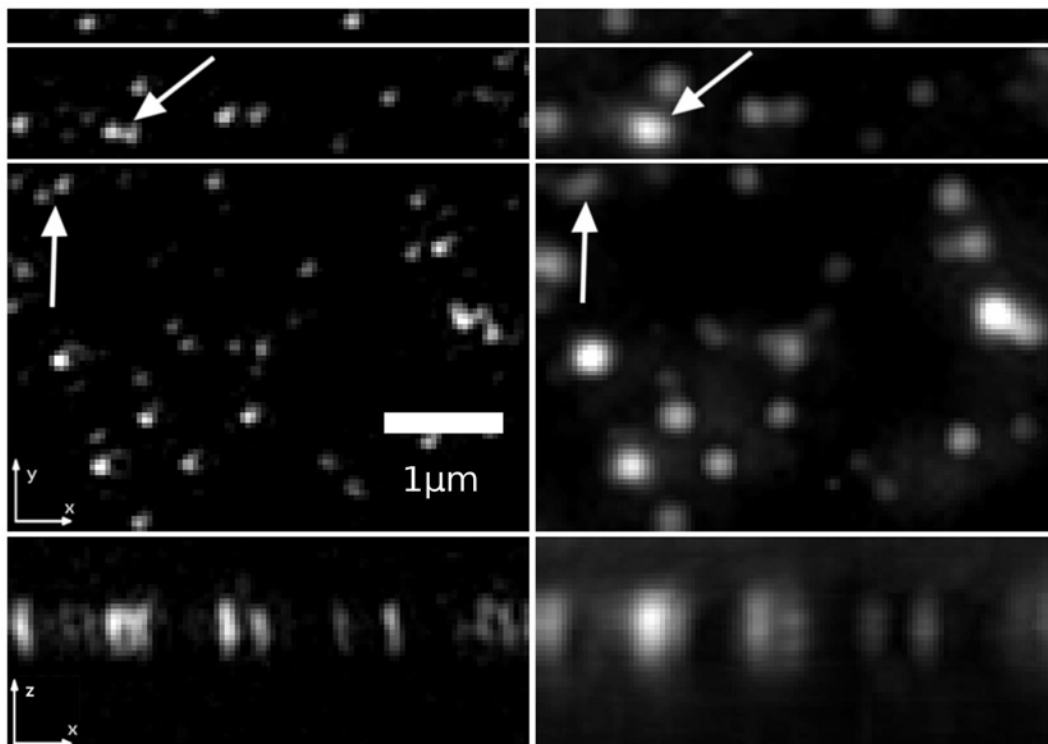
(a) Linienkonfokales mikroskopisches Bild.



(b) Bild mit linienkonfokaler hexagonaler SIM.

**Abb. 6.7.:** Vergleich zwischen linienkonfokaler Mikroskopie und XL-SIM mit 50nm Beads. Die Fläche des gesamten Bildfeldes beträgt etwa  $(84 \times 84) \mu\text{m}^2$ .

liegt, als Objekte benutzt (G50 von ThermoFisher Scientific). Hierbei wurde ein Deckglas (Zeiss #1,5) mit Polylysin beschichtet, gereinigt und getrocknet. Anschließend wurde ein Tropfen verdünnter Bead-Lösung auf das beschichtete Deckglas aufgebracht. Nach wenigen Minuten wurde das Deckglas gewaschen und getrocknet. Danach wurde die Probe mit UV-Kleber NOA63 rasch (innerhalb weniger Sekunden) am Objektträger versiegelt.

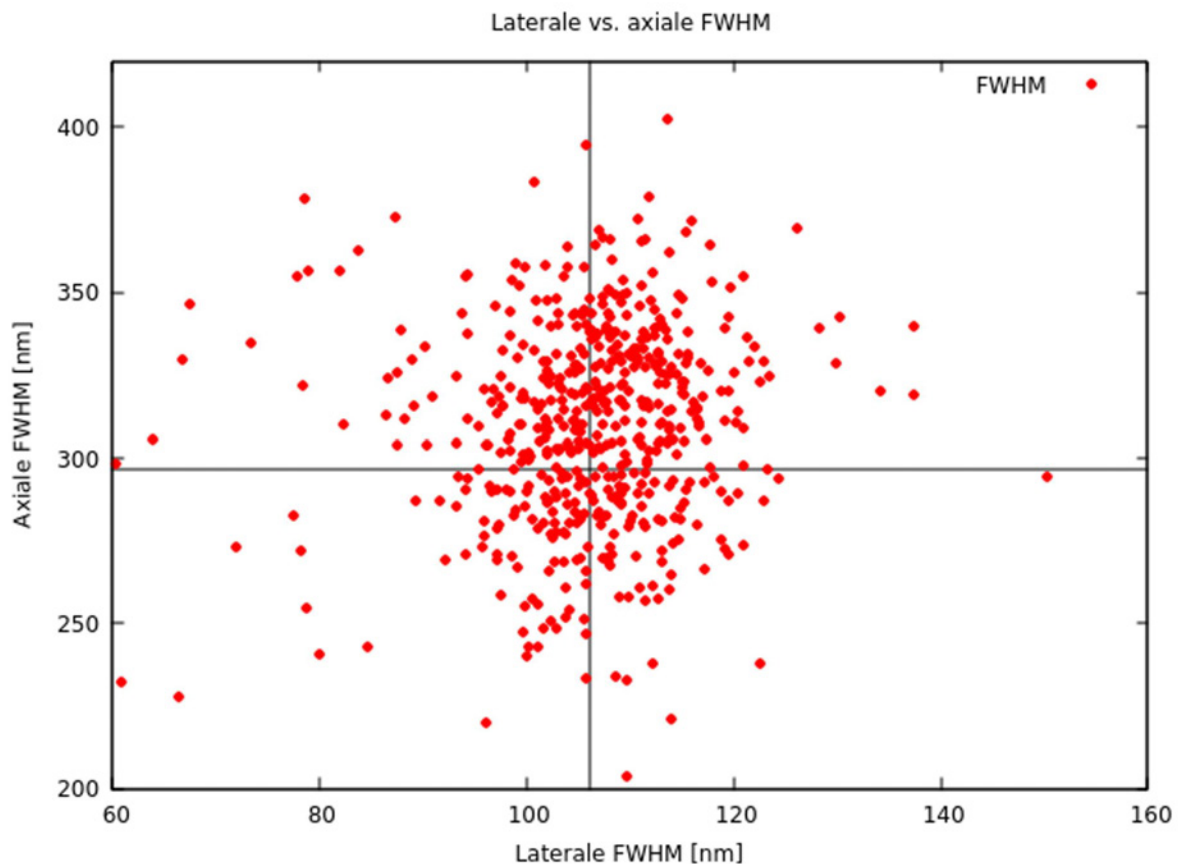


**Abb. 6.8.:** Vergrößerte Darstellung des markierten Bereiches in Abbildung 6.7. Links oben: XL-SIM Bild; rechts oben: LC Bild. Die Pfeile zeigen Stellen im Objekt an, die im LC Bild nicht mehr aufgelöst werden, während man im XL-SIM Bild die einzelnen Beads noch deutlich getrennt sehen kann. Für die Intensitätswerte innerhalb der weißen Linien oben wurden Maximum-Projektionen in  $y$ -Richtung berechnet, welche jeweils unten für LC und XL-SIM gezeigt sind.

In diesem und den folgenden Versuchen wurde die Breite des Rolling Shutters auf seinen minimal möglichen Wert von 10 Pixeln eingestellt, d.h. die Phasenbilder werden linienkonfokal (LC) detektiert. Die Messungen mit hexagonaler SIM werden im Folgenden daher als hexagonale linienkonfokale SIM (XL-SIM) bezeichnet. Durch die Probe wird ein  $z$ -Stapel von Phasenbildern aufgenommen, wobei in jeder Ebene des Stapels insgesamt 19 Phasenbilder abgespeichert wurden. Der Abstand der Ebenen im Bildstapel beträgt 100nm.

Abbildung 6.7 zeigt das gesamte Bildfeld. Der mit dem weißen Quadrat markierte Bereich

ist vergrößert in Abbildung 6.8 gezeigt. Einige der Intensitätsprofile der Beads überlappen im LC Bild so stark, dass man sie nicht mehr als getrennte Lichtquellen wahrnehmen kann, während sie im XL-SIM Bild noch getrennt dargestellt werden (siehe die weißen Pfeile). Unten in Abbildung 6.7 ist eine  $(x/z)$  Projektion des Bead-Volumens gezeigt. Man kann gut sehen, dass das XL-SIM Bild noch deutlich weniger Ausserfokus-Signal enthält als das LC Bild.



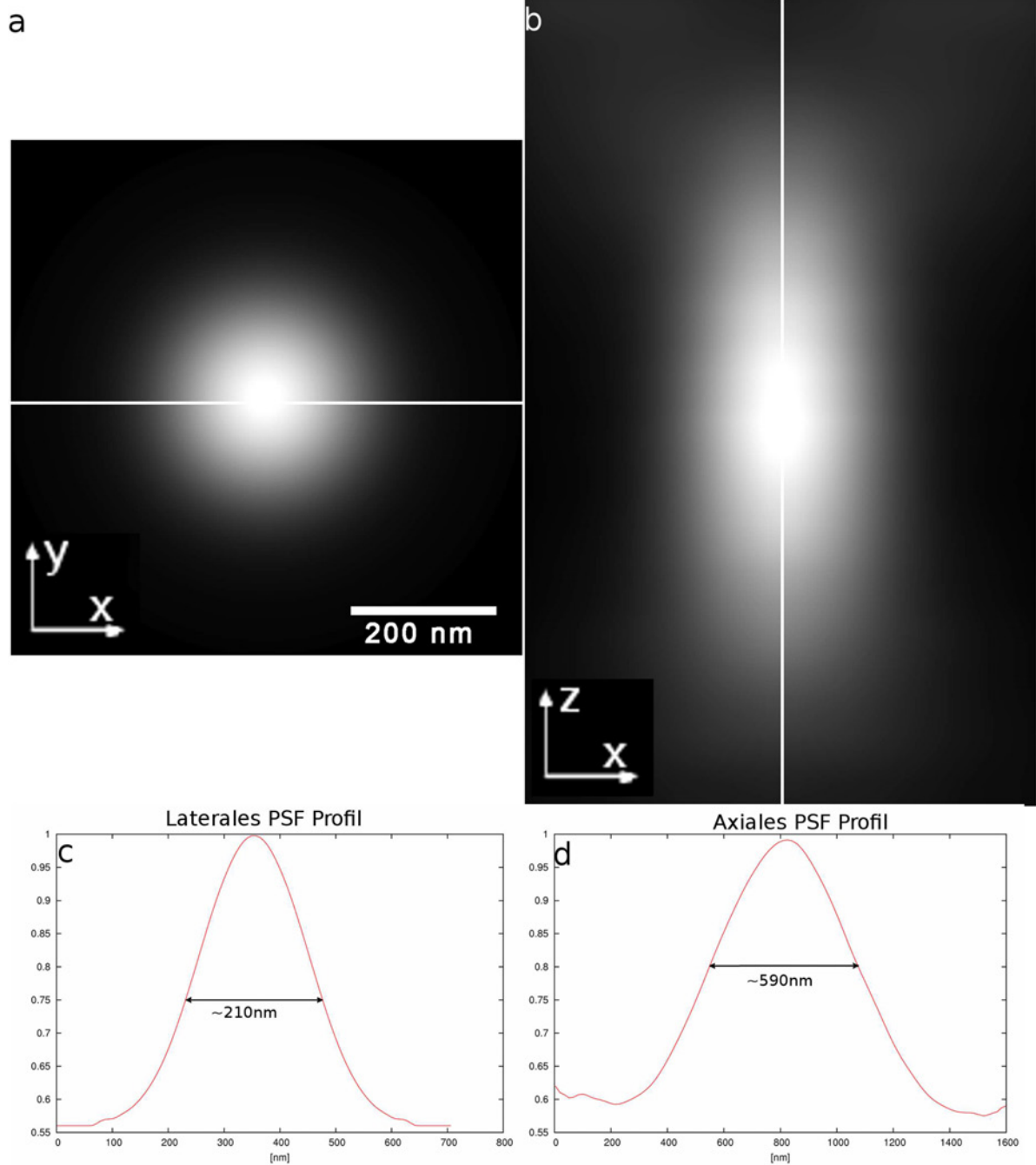
**Abb. 6.9.:** Grafische Darstellung der ermittelten Halbwertsbreiten in  $(x/y)$  und  $z$ .

Um aus den Aufnahmen mit den Beads ein Maß für die Auflösung des XL-SIM Mikroskops zu erhalten, wurde eine Gauß-Funktion an insgesamt 537 isolierte Bead-Intensitätsverteilungen gefittet und so die Halbwertsbreiten der Verteilungen in  $(x/y)$  und  $z$  bestimmt. Abbildung 6.9 zeigt eine grafische Darstellung der ermittelten Halbwertsbreiten. Die laterale Auflösung als Mittelwert der lateralen Halbwertsbreiten beträgt  $(106,1 \pm 10,0)\text{nm}$ , die axiale Auflösung beträgt  $(296,8 \pm 38,2)\text{nm}$ .

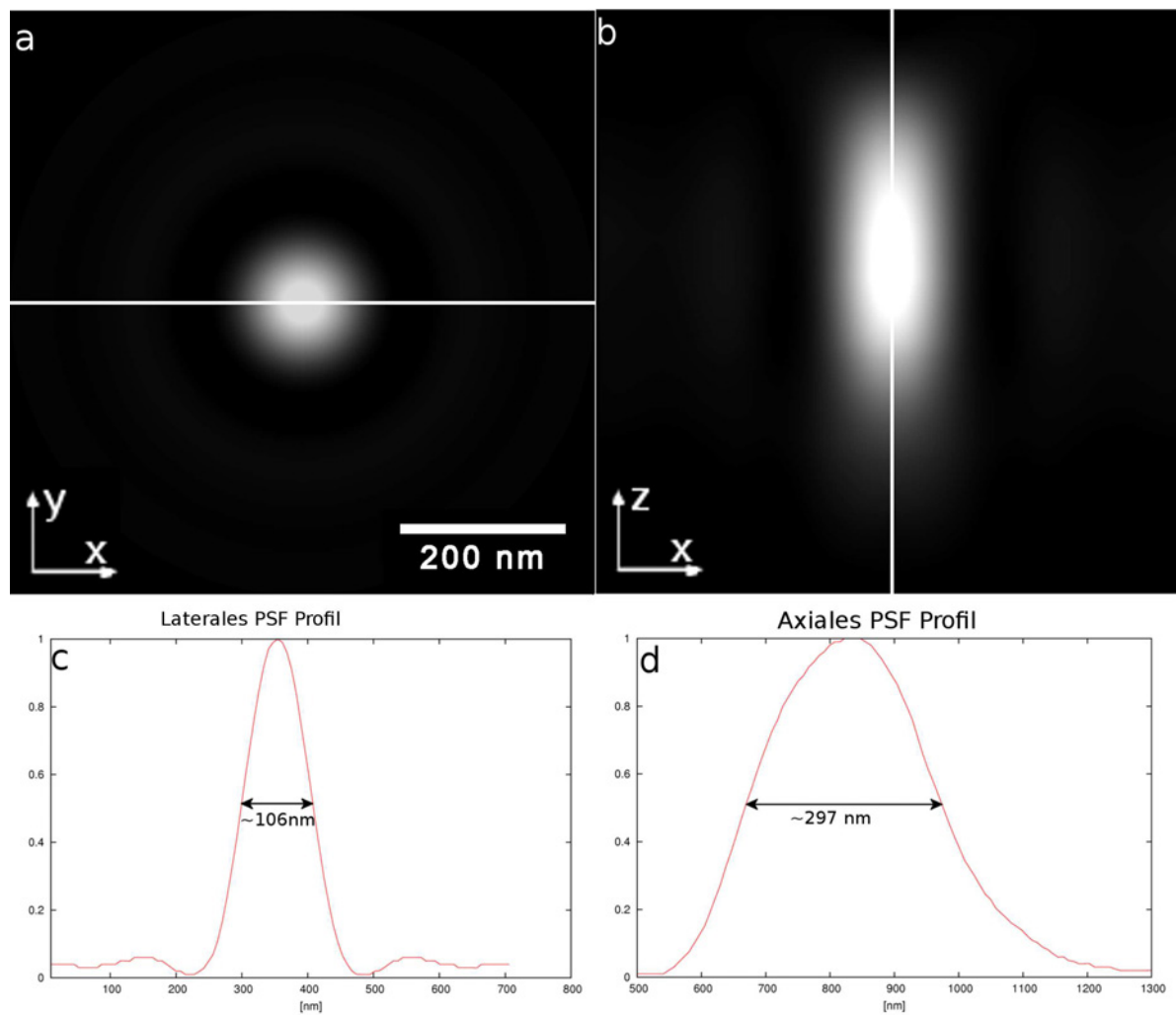
Die Werte für die laterale Auflösung, die durch FRC und die FWHM der PSFs ermittelt wurden stimmen sehr gut miteinander und mit der theoretischen Erwartung überein. Sowohl die ermittelte laterale als auch die axiale Auflösung stimmen gut mit den Werten überein, die bei anderen SIM Mikroskopen mit dieser Gitterperiode und NA gemessen wurde [Gus00a, Gus08, Sch08].

Aus dem Messvolumen wurden insgesamt 10 isolierte Intensitätsprofile ausgewählt, die dann subpixelgenau überlagert und axial gemittelt wurden. Das Ergebnis ist in den Abbildungen 6.10 für die LC PSF und 6.11 für die XL-SIM PSF gezeigt.





**Abb. 6.10.:** Gemittelte linienkonfokale PSF für die Messung aus Abschnitt 6.2.2. Die  $(x/y)$  und  $(x/z)$  Schnitte der PSF sind in (a) und (b) gezeigt. Die Pixelgrößen in  $(x/y)$  sind die gleichen wie in  $(x/z)$ . Die Intensitätsprofile entlang der weißen Linien in (a) und (b) sind in den Diagrammen (c) und (d) eingezeichnet.



**Abb. 6.11.:** Gemittelte linienkonfokale hexagonale SIM PSF für die Messung aus Abschnitt 6.2.2. (a) und (b) zeigen die  $(x/y)$  und  $(x/z)$  Schnitte der PSF. Die Intensitätsprofile entlang der weißen Linien in (a) und (b) sind in (c) und (d) eingezeichnet.

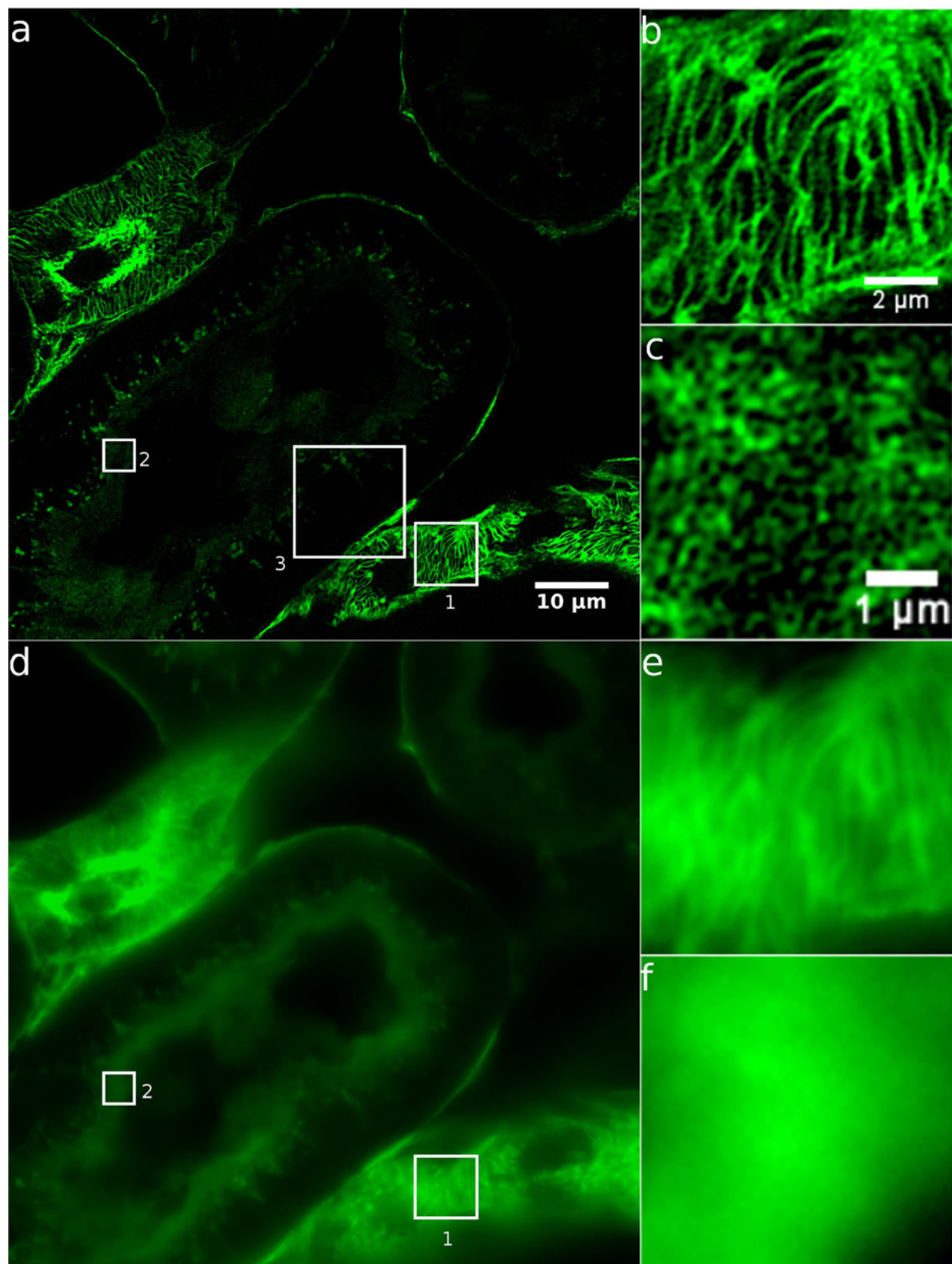
## 6.3. Messungen mit Dicken Proben

Um die linienkonfokale hexagonale SIM mit dicken Proben zu untersuchen, wurde die Testprobe *FluoCells® Prepared Slide #3* der Firma *ThermoFisher Scientific* verwendet. Diese Probe ist ein Schnitt einer Mäuseniere und ist gefärbt mit Alexa Fluor® 488 WGA, Alexa Fluor® 568 Phalloidin, und 4', 6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Die durchschnittliche Dicke der Probe beträgt etwa 16µm, die maximale Probendicke beträgt etwa 20µm. Da die Probendicke bei einem konventionellen SIM Mikroskop idealerweise nicht dicker als wenige µm betragen sollte, ist diese Probe normalerweise nicht gut für SRSIM geeignet.

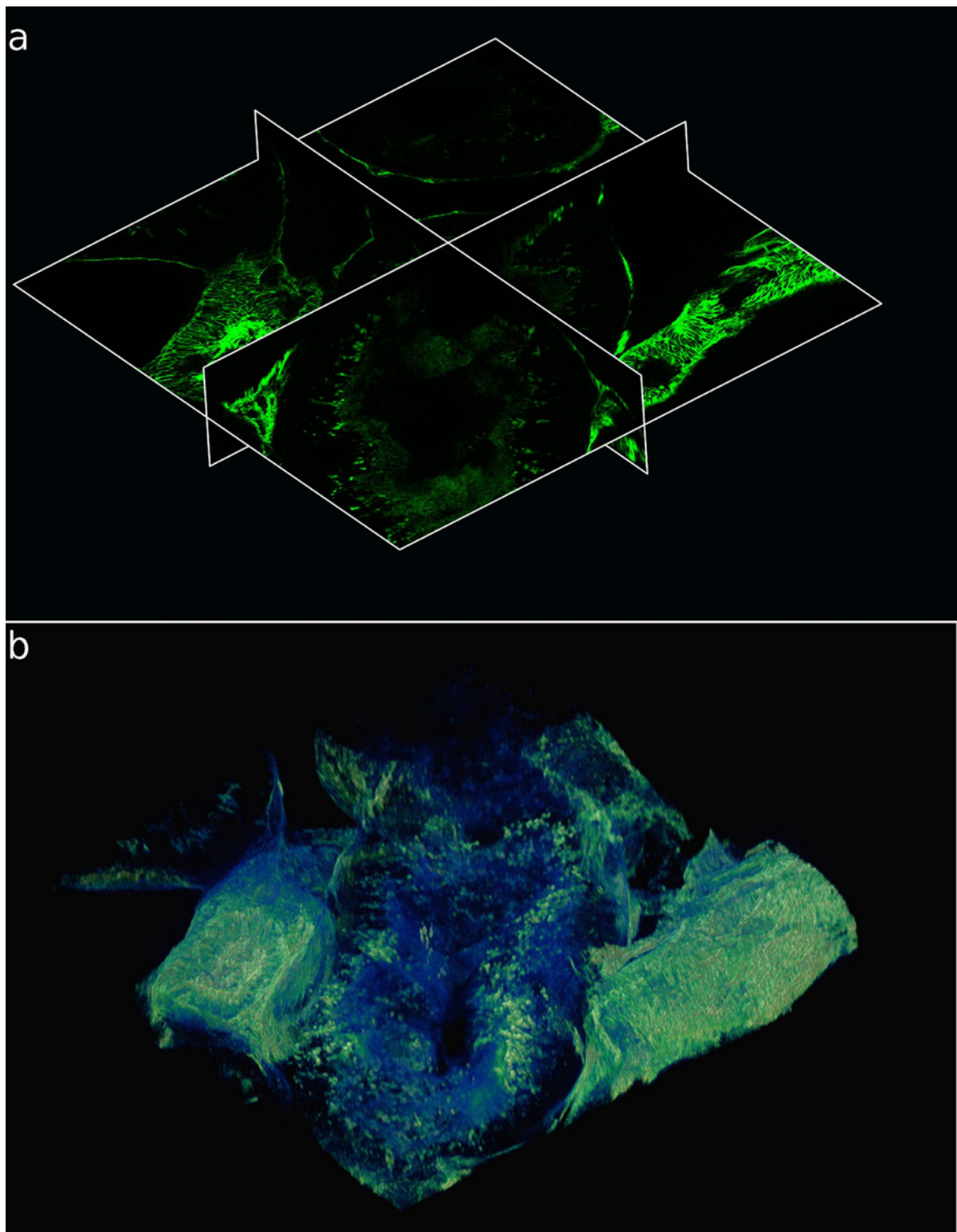
Wie in den Messungen im vorherigen Abschnitt wurde die Rolling-Shutter Breite auf ihren minimal möglichen Wert von 10 Pixeln eingestellt. Die Ausgangsleistung des Lasers betrug bei der folgenden Messung 30mW. Es wurde ein *z*-Stapel mit insgesamt 170 Ebenen und einem Abstand von 100nm zwischen den Ebenen aufgenommen. Die gesamte Belichtungszeit in jeder Ebene wurde auf 20,9ms eingestellt, indem pro Ebene 38 Phasenbilder aufgenommen wurden. Die gesamte Aufnahmezeit pro Ebene betrug daher 380ms.

Ein XL-SIM Bild aus der Mitte des ausgewerteten Bildstapels ist in Abbildung 6.12(a), das entsprechende LC Bild in Abbildung 6.12(d) gezeigt. Die mit „1“ und „2“ markierten Bereiche sind für das XL-SIM Bild in den Abbildungen 6.12(b) und (c), für das LC Bild in den Abbildungen 6.12(e) und (f) gezeigt. In beiden Bereichen wird die Auflösung im LC Bild durch das gemessene Ausserfokus-Signal beeinträchtigt. Dieses restliche Ausserfokus-Signal ist in den XL-SIM Bildern nicht mehr enthalten. In den Bereichen in Abbildung 6.12(b) und (c) kann man jeweils noch Strukturen deutlich unterhalb von 1µm erkennen.

Abbildung 6.13 zeigt das Bild aus Abbildung 6.12(a) als (*x/y*) Schnitt eines 3D-Volumens mit einem (*x/z*) und (*y/z*) Schnitt. Das gesamte Volumen ist in Abbildung 6.13(b) als 3D Objekt gezeigt. Diese Darstellung wurde mit der Software *Amira 3D Software for Life Sciences* von der Firma *FEI* erzeugt. Das gesamte Messvolumen hat eine Größe von  $(86 \times 86 \times 17)\mu\text{m}^3$ .



**Abb. 6.12.:** Vergleich zwischen einem XL-SIM und einem LC Bild mit einem Schnitt aus einer Mäuseniere. Ein Bild aus der Mitte des XL-SIM Volumens ist in (a), ein Bild des LC-Bildvolumens in (d) gezeigt. Die mit „1“ und „2“ markierten Bereiche sind in (b) und (c) für XL-SIM und in (e) und (f) für LC gezeigt.



**Abb. 6.13.:** Dreidimensionale Darstellungen des Volumens aus Abbildung 6.12. (a) zeigt je einen  $(x/y)$ -,  $(y/z)$ - und  $(x/z)$ - Schnitt des gemessenen Volumens, wobei der  $(x/y)$ -Schnitt mit dem Bild in Abbildung 6.12(a) übereinstimmt. In (b) ist das Volumen als 3D Objekt dargestellt.

### 6.3.1. Vergleich mit dem OMX Mikroskop

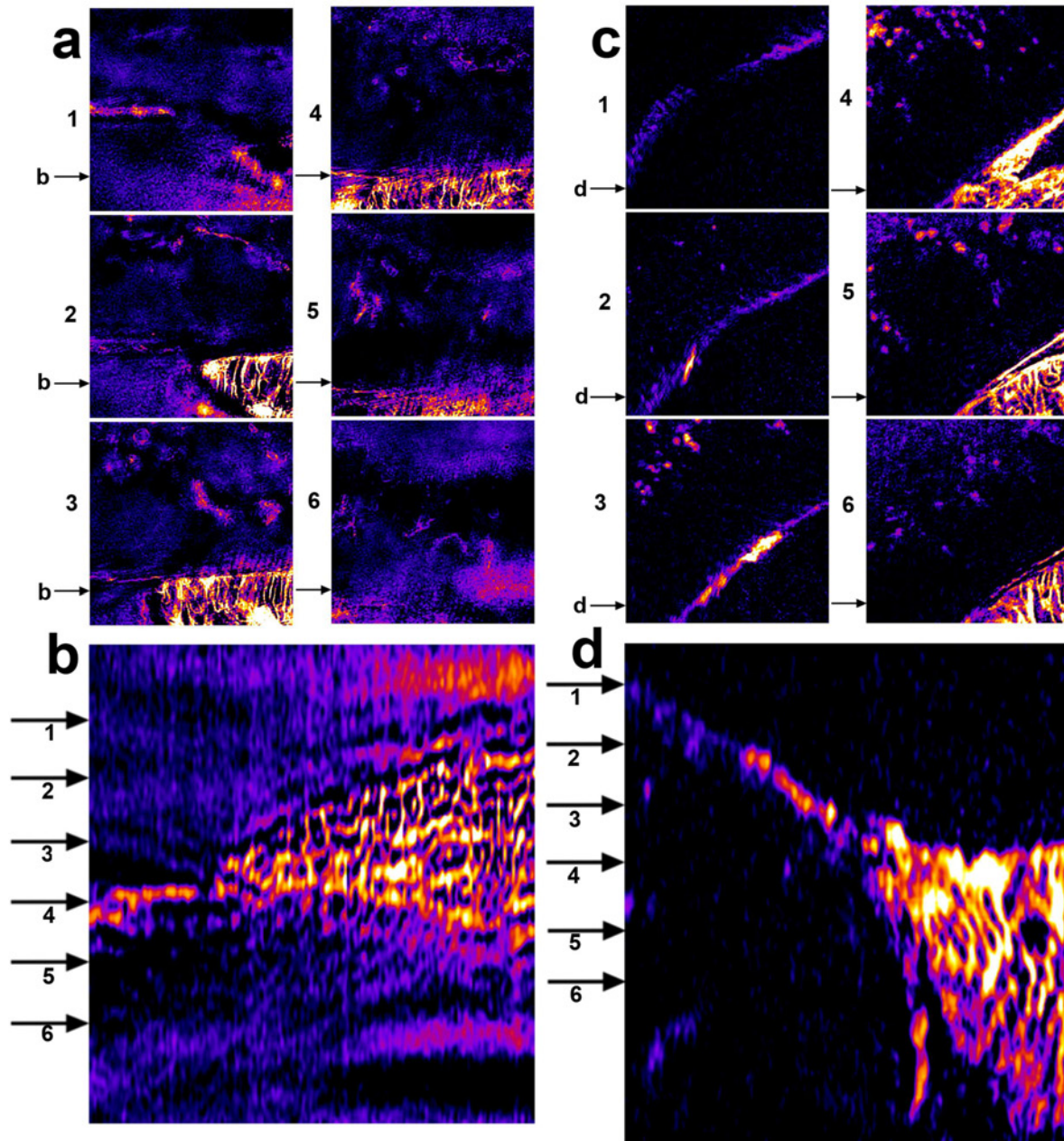
Um die XL-SIM mit den herkömmlichen SIM Verfahren mit flächiger Beleuchtung mit Linienmustern zu vergleichen, wurde dieselbe Probe wie im vorhergehenden Abschnitt 6.3 am *DeltaVision OMX* Mikroskop der Firma *GE Healthcare Life Sciences* am Center of Advanced Light Microscopy (CALM) der LMU München aufgenommen. Es wurde eine vergleichbare Stelle der Probe gewählt, die ähnliche Strukturen zeigt wie in Abbildung 6.12.

Abbildung 6.14(a) zeigt OMX Bilder aus gewählten Fokusebenen und einen  $(x/z)$ -Schnitt des gemessenen Volumens in (b). Die entsprechenden  $(x/y)$  Bilder bzw.  $(x/z)$  Schnitte für XL-SIM sind in den Abbildungen 6.14(c) und (d) gezeigt. Der gewählte Bereich entspricht dem in Abbildung 6.12 mit „3“ markiertem Bereich. Die Abmessungen der gezeigten Bildbereiche betragen  $(15 \times 15) \mu\text{m}^2$ . Die Dicke des OMX-Bildvolumens beträgt etwa  $16 \mu\text{m}$ , die Dicke des XL-SIM Bildvolumens beträgt wie oben geschrieben  $17 \mu\text{m}$ . Das gesamte Bildfeld für die Bereiche in den Abbildungen 6.14(a) und (b) ist in Abbildung 6.15 für die Mitte des OMX-Volumens gezeigt.

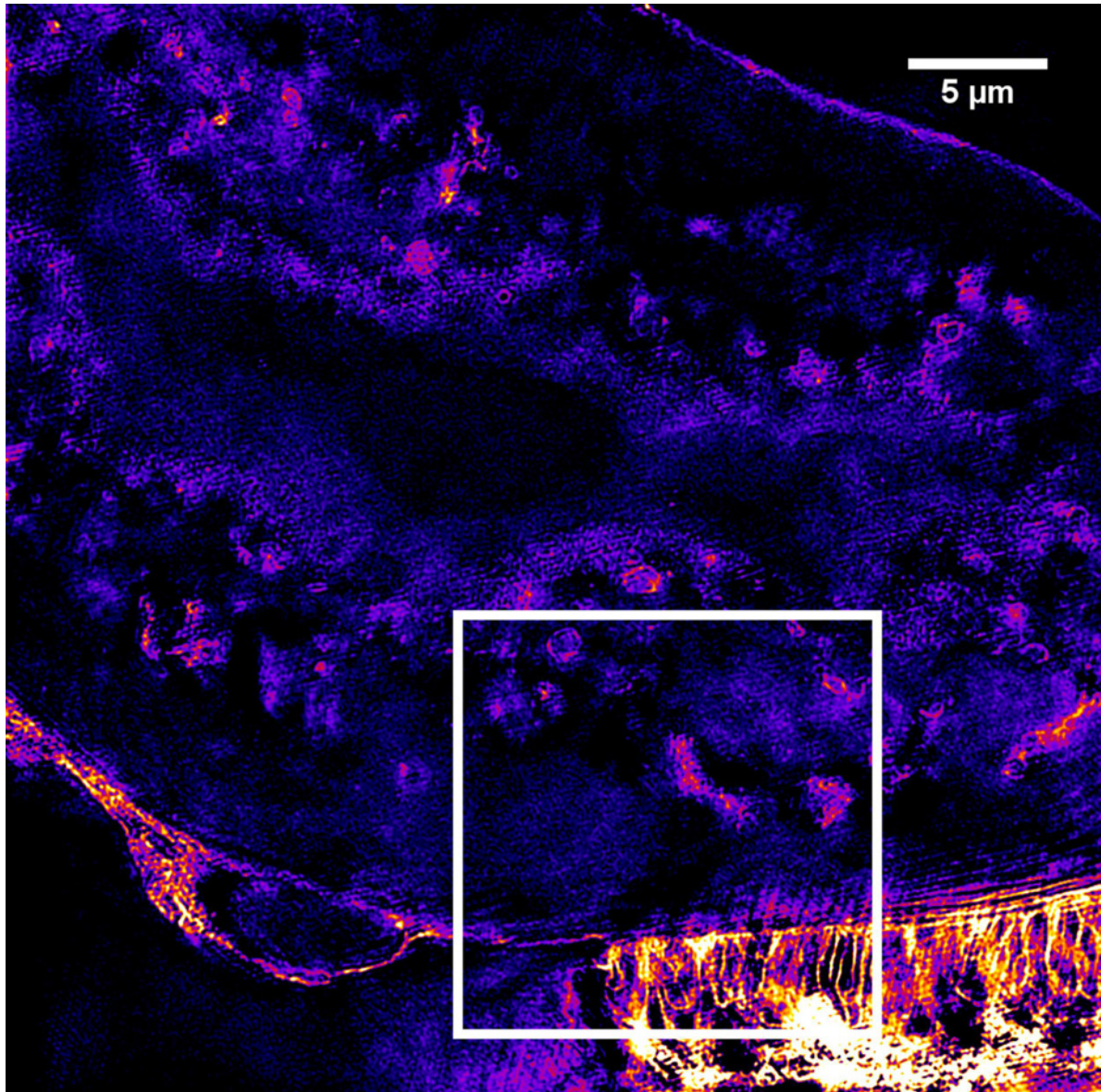
Man kann deutlich erkennen, wie das detektierte Ausserfokussignal in den OMX-Bildern in Abbildung 6.14(a) zu Artefakten führt und daher die Bildqualität vermindert, während diese Ausserfokus-Artefakte in den XL-SIM Bildern nicht vorkommen und dass die Bildqualität vergleichbar zu dünnen Proben ist (vgl. Abschnitt 6.1).

Der  $(x/z)$  Schnitt in Abbildung 6.14(b) zeigt, dass das Ausserfokussignal (und dementsprechend auch das Rauschen des Ausserfokussignals) zu einer Art „Echo“ im ausgewerteten SRSIM Volumen führt. Dieses Echo entspricht gerade den Nebenmaxima der in Abbildung 4.10 gezeichneten SIM Konfokalitätsfunktion. Im Gegensatz zu dem OMX SIM Messungen, ist in dem  $(x/z)$ -Schnitt des XL-SIM Bildvolumens kein Ausserfokus-Echo erkennbar. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der Tatsache, dass die Nebenmaxima der Konfokalitätsfunktion für XL-SIM deutlich kleiner sind als für SIM.





**Abb. 6.14.:** Vergleich mit dem OMX Mikroskop: (a) sechs Fokusebenen des OMX-Bildstapels. (b):  $(x/z)$  Schnitt desselben Bildstapels. Die Pfeile in (a) zeigen die  $y$ -Position des  $(x/z)$ -Schnitts in (b) an. Die Pfeile in (b) zeigen die Fokuspositionen der  $(x/y)$  Schnitte in (a) an. Die entsprechenden Schnitte für XL-SIM sind in (c) und (d) gezeigt.



**Abb. 6.15.:** Gesamtes Bildfeld der OMX-Messung. Das weiße Quadrat markiert den in den Abbildungen 6.14(a) und (b) gezeigten Bereich.



## 7. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Es wurde gezeigt, dass Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung auch mit zweidimensionalen Mustern (d.h. mit Schachbrett- und Hexagonmustern) machbar ist, und dass es reicht, das Bild des Musters unter einem bestimmten (vom Muster abhängigen) Winkel zu verschieben. Im Fall von quasikonfokaler SIM erhält man zumindest theoretisch sowohl für Schachbrett- als auch für Hexagonmuster im Vergleich zu den Liniengittern ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Sowohl in der Theorie als auch im Experiment konnte gezeigt werden, dass die Raumfrequenzspektren der SIM Bilder mit zweidimensionalen Mustern deutlich weniger richtungsabhängig sind, als bei Verwendung von Linienmustern. Der Fehler des Orientierungswinkels  $\theta$  verstärkt zwar die gemessenen Fehler in der Auswertung, dafür muss dieser Winkel – wenn er einmal eingestellt ist – während der Messung nicht mehr verändert werden.

Weiterhin wurde speziell für die hexagonalen Muster gezeigt, dass mit strukturierter Beleuchtung mit hexagonalen Mustern dieselbe Auflösungssteigerung möglich ist, wie mit dem üblichen Liniengitter-Verfahren. Die erreichte Auflösung wurde qualitativ und quantitativ untersucht und es wurde mit zwei unabhängigen Methoden eine laterale Auflösung von etwa 106nm, für die axiale Auflösung ein Wert von 297nm gemessen. Beide Werte entsprechen einer verdoppelten Auflösung im Vergleich zu einem beugungsbegrenzten Mikroskop. Nicht nur in biologischen Anwendungen ist dieser Unterschied in der optischen Auflösung essentiell; vor kurzem wurde die auflösungssteigernde Anwendung von SIM z.B. auch für die Spektroskopie von  $\alpha$ -Teilchen benutzt [Kou18].

Hexagonale Muster bieten im Gegensatz zu Linienmustern den Vorteil einer einfacheren und

stabileren Bildaufnahme. Dies trifft vor allem bei 3D SIM mit dicken Proben zu, da im Gegensatz zu Linienmustern die Aufnahme nur eines (statt dreier)  $z$ -Stapel ausreicht.

Darüber hinaus können bei hexagonaler SIM alle aufgenommenen Rohbilder zur Auswertung aller Frequenzbänder benutzt werden, wohingegen bei Liniengitter-SIM nur diejenigen Rohbilder, die der Orientierung des jeweiligen Frequenzbandes entsprechen, bei der Auswertung des Frequenzbandes berücksichtigt werden. Der Vorteil der sich hieraus bezüglich des erreichbaren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses ergibt, wird allerdings dadurch kompensiert, dass die erreichbaren Modulationen der Anregungsintensität durch die Polarisierung des Anregungslichts beim hexagonalen Muster verringert werden.

Im direkten Vergleich mit der Liniengitter-SIM ergibt sich aber noch ein weiterer Vorteil mit hexagonalen Mustern: Die Fehler der Frequenzvektoren pflanzen sich in der Auswertung direkt in die Fehler der Nullphasen der Frequenzbänder fort, wobei diese wiederum einen direkten Einfluss auf das erreichbare Signal-zu-Rausch-Verhältnis im Superresolution SIM Bild haben (vgl. Abschnitt 3.3.1). Falls die Frequenzvektoren – im Fall von Liniengitter SIM – bei der Messung bestimmt werden müssen, so wird das Signal-zu-Rausch-Verhältnis des SIM Bildes (z.B. bei dicken Proben) durch den Fehler des Frequenzvektors zusätzlich verringert. Bei Verwendung hexagonaler Muster können die Frequenzvektoren bereits vor der Messung kalibriert werden.

Ein SIM Mikroskop mit hexagonalen Mustern kann auch immer zur Auflösungssteigerung benutzt werden. Aufgrund dessen, dass die Drehung des Musterbildes bei der Messung entfällt, kann das Verfahren auch in deutlich kompakteren Mikroskopen als bisher Anwendung finden.

Ausserdem wurde hexagonale SIM mit linienkonfokaler Mikroskopie kombiniert und gezeigt, dass diese Methode auch für dicke und dicht gefärbte Proben gut geeignet ist, um Bilder mit gesteigerter Auflösung zu erhalten.

Die linienkonfokale Anregung und Detektion wurde durch eine hexagonal modulierte Laserlinie, deren Bewegung über die Probe mit dem Rolling-Shutter der sCMOS Kamera synchronisiert wurde, erzeugt. Durch die Linienkonfokalität wird das in den SIM Rohbildern detektierte Ausserfokussignal reduziert; dadurch wird das Signal-zu-Rausch-Verhältnis in den ausgewerteten SIM Bildern gesteigert und entsprechende Artefakte werden reduziert bzw. vermieden. Durch die Kombination mit konfokaler Mikroskopie wird die Anwendung von SIM auf dickere Proben ermöglicht.

---

Die Konfokalität ist bei der linienförmigen Anregung durch die minimale Breite der Anregungslinie (siehe Abschnitt 4.5.2) beschränkt. Eine schmaler gewählte Anregungslinie würde zu Kontrastverlust und Inhomogenitäten in den Kontrastwerten der Anregungsfrequenzen führen.

Eine Möglichkeit das detektierte Ausserfokussignal bei hexagonaler strukturierter Beleuchtung weiter zu reduzieren könnte z.B. darin bestehen, anstelle die Probe mit einer hexagonal modulierten Linie, mit einem hexagonal moduliertem (z.B. kreisförmigen) Bereich anzuregen und abzutasten, wobei die räumliche Ausdehnung des Anregungsbereiches im Fall kohärenter Beleuchtung erneut eine minimale Größe aufweisen muss, um die Interferenz der Beugungsordnungen zur Erzeugung der Anregungskontraste des SIM Musters zu ermöglichen.

Die in der Arbeit verwendete lineare Polarisierung des Anregungslichtes im Fall von Superresolution SIM führt bei der Interferenz der Beugungsordnungen in der Probe zu Inhomogenitäten in den Anregungskontrasten (siehe Anhang K). Dieses Problem könnte durch azimuthal polarisiertes Anregungslicht verbessert werden.

Die in der Arbeit beschriebenen Verschiebewinkel für hexagonale Muster (für mehr als 5 bzw. 7 Frequenzordnungen - siehe Anhang H bzw. I) eignen sich prinzipiell auch für eine konfokale Abtastung der Probe mit mehreren Punkten und könnten so auch in anderen auflösungssteigernden Verfahren wie z.B. ISM [She13, Sch13, Rot13] verwendet werden.



# A. Grundlegende Definitionen

Dieser Abschnitt gibt einen Überblick über die in der Arbeit verwendeten mathematischen Grundlagen und Definitionen.

- Ein Körper ist eine Menge (von Zahlen)  $\mathbb{K}$ , versehen mit zwei inneren Verknüpfungen, welche jeweils zwei Elemente der Menge in die Menge abbilden. Diese Verknüpfungen sind Addition „+“ und Multiplikation „ $\cdot$ “. In dieser Arbeit ist z.B.  $\mathbb{K}$  der Körper der reellen ( $\mathbb{K} = \mathbb{R}$ ), der Körper der Komplexen ( $\mathbb{K} = \mathbb{C}$ ) oder der Körper der ganzen Zahlen  $\mathbb{K} = \mathbb{Z}$ . Im Gegensatz dazu gibt es auch Zahlkörper mit endlich vielen Elementen.
- $\mathbb{F}_p$  bezeichnet den Körper der Restklassen ganzer Zahlen modulo  $p$ .
- Für eine reelle Zahl  $x \in \mathbb{R} \not\subset \mathbb{Z}$ , bezeichnet  $\lfloor x \rfloor \in \mathbb{Z}$  die größte ganze Zahl kleiner oder gleich  $x$  und  $\lceil x \rceil \in \mathbb{Z}$  die kleinste ganze Zahl größer oder gleich  $x$ .
- Die komplex konjugierte einer komplexen Zahl  $z \in \mathbb{C}$  wird in dieser Arbeit abgekürzt als  $z^*$ .
- Der Realteil einer komplexen Zahl  $z$  wird in dieser Arbeit mit  $\Re(z)$ , der Imaginärteil mit  $\Im(z)$  bezeichnet.
- Jede komplexe Zahl kann gemäß  $z = |z| \cdot e^{i \arg(z)}$  in Exponentialform geschrieben werden, wobei  $|z|$  den Betrag und  $\arg(\cdot)$  das Argument der komplexen Zahl bezeichnet.
- Die Norm  $\|\cdot\|$  eines Vektors  $\vec{v} \in \mathbb{K}^N$  erfüllt die Eigenschaften

$\ \vec{v}\  \geq 0$	$\forall \vec{v}, \text{ und } \ \vec{v}\  = 0 \Leftrightarrow \vec{v} = 0$
$\ c\vec{v}\  =  c  \ \vec{v}\ $	$\forall c \in \mathbb{K}$
$\ \vec{v} + \vec{w}\  \leq \ \vec{v}\  + \ \vec{w}\ $	$\forall \vec{v}, \vec{w}$ (Dreiecksungleichung)

Ein Beispiel für die Norm ist die *euklidische Norm* oder auch  $L_2$ -Norm

$$|\vec{v}| := \|\vec{v}\|_2 = \left( \sum_{n=1}^N v_n^2 \right)^{\frac{1}{2}},$$

welche ein Spezialfall der sog.  $L_p$ -Norm  $\left( \|\vec{v}\|_p := \left( \sum_n v_n^p \right)^{\frac{1}{p}} \right)$  für  $p = 2$  ist. Für  $p \rightarrow \infty$  wird daraus die sog. *Maximumsnorm*:

$$\|\vec{v}\|_\infty := \max_{n \in \{1 \dots N\}} |v_n|.$$

- Eine *Matrix* ist eine rechteckige Anordnung (bzw. Tabelle) von Zahlen. Matrizen spielen in der linearen Algebra eine große Rolle. In dieser Arbeit werden  $M \times N$  Matrizen folgendermaßen bezeichnet und indiziert:

$$\hat{A} = (a)_{k,l} = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} & \dots & a_{1N} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} & \dots & \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} & \dots & \\ \vdots & & & \ddots & \\ a_{M1} & & & & a_{MN} \end{pmatrix} = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} & \dots & a_{1N} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} & \dots & \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} & \dots & \\ \vdots & & & \ddots & \\ a_{M1} & & & & a_{MN} \end{bmatrix}$$

Die Menge aller  $M \times N$  Matrizen über dem Körper  $\mathbb{K}$  wird als  $\mathbb{K}^{M \times N}$  bezeichnet.

- Die zu  $\hat{A} = (a)_{k,l}$  transponierte Matrix wird folgendermaßen definiert und bezeichnet:  $\hat{A}^t := (a)_{l,k}$ . Dementsprechend wird auch der zum Vektor  $\vec{v}$  transponierte Vektor mit  $\vec{v}^t$  bezeichnet.
- Die Determinante einer quadratischen Matrix  $\hat{A} \in \mathbb{K}^{N \times N}$  wird als  $\det(\hat{A})$  bezeichnet und ihr Wert entspricht anschaulich dem  $N$ -dimensionalen Volumen, das von den Zeilen- bzw. Spaltenvektoren der Matrix aufgespannt werden. ( $\det(\hat{A}) = \det(\hat{A}^t)$ )
- Die zu  $\hat{A} = (a)_{k,l}$  adjungierte Matrix  $\hat{A}^\dagger$  ist die transponierte und komplex konjugierte Matrix  $\hat{A}: \hat{A}^\dagger := (\hat{A}^t)^*$
- Das Standardskalarprodukt für zwei komplexe Vektoren  $\vec{v}$  und  $\vec{w}$  ist definiert durch:

$$\langle \vec{v}, \vec{w} \rangle := \sum_{m=1}^N v_m w_m^* = \vec{w}^\dagger \cdot \vec{v}$$

- Die zu  $\hat{A} \in \mathbb{K}^{N \times N}$  inverse Matrix wird notiert als  $\hat{A}^{-1}$ . Sie existiert nur, falls ( $M = N$ ) und  $\det(\hat{A}) > 0$ . Es gilt  $\hat{A} \cdot \hat{A}^{-1} = \mathbb{1}_N$ , wobei  $\mathbb{1}_N$  die  $N$ -dimensionale Einheitsmatrix

bezeichnet. Die Invertierung einer Matrix ist äquivalent zur Lösung eines linearen Gleichungssystems

$$\hat{A}\vec{x} = \vec{y} \Rightarrow \vec{x} = \hat{A}^{-1}\vec{y} \quad . \quad (\text{A.1})$$

Falls  $\det(\hat{A}) > 0$  gilt, sind die Zeilen des linearen Gleichungssystems linear unabhängig. Für den Fall, dass  $M > N$  ist, und dass die  $N$  Spalten der Matrix paarweise linear unabhängig sind, so ist das Gleichungssystem überbestimmt, die sog. *Pseudo-Inverse* der Matrix  $\hat{A}$ , welche als  $\hat{A}^+$  bezeichnet wird, existiert und es gilt

$$\hat{A}^+ = (\hat{A}^\dagger \hat{A})^{-1} \hat{A}^\dagger \quad .$$

Im Folgenden werden in diesem Anhang nur noch quadratische Matrizen betrachtet.

- die Norm  $\|\cdot\|$  einer quadratischen Matrix  $\hat{A} \in \mathbb{K}^{N \times N}$  erfüllt die Eigenschaften:

$$\begin{aligned} \|\hat{A}\| &\geq 0 & \forall \hat{A}, \text{ und } \|\hat{A}\| = 0 &\Leftrightarrow \hat{A} = 0 \\ \|c\hat{A}\| &= c\|\hat{A}\| & \forall c \in \mathbb{K} \\ \|\hat{A} + \hat{B}\| &\leq \|\hat{A}\| + \|\hat{B}\| & \forall \hat{A}, \hat{B} \text{ (Dreiecksungleichung)} \\ \|\hat{A} \cdot \hat{B}\| &\leq \|\hat{A}\| \cdot \|\hat{B}\| & \forall \hat{A}, \hat{B} \text{ (Submultiplikativität)} \end{aligned}$$

Beispiele für die Matrixnorm sind

$$\begin{aligned} \|A\|_Z &:= \max_{k \in \{1 \dots N\}} \sum_{m=1}^N |a_{k,m}| = \max_{\|\vec{v}\|_\infty=1} \|\hat{A}\vec{v}\|_\infty & \text{Zeilensummennorm} \\ \|A\|_F &:= \left( \sum_{k=1}^N \sum_{m=1}^N a_{k,m}^2 \right)^{\frac{1}{2}} & \text{Frobeniusnorm} \\ \|A\|_S = \|A\|_2 &:= \max_{\vec{v} \neq \vec{0}} \frac{\|\hat{A}\vec{v}\|_2}{\|\vec{v}\|_2} & \text{Spektralnorm bzw. auch 2-Norm} \end{aligned} \quad (\text{A.2})$$

Die Zeilensummennorm wird auch als *natürliche Norm* bezeichnet. Die Spektralnorm entspricht anschaulich dem größten Streckungsfaktor den ein Vektor durch Multiplikation mit der Matrix erfahren kann. Der Wert der Spektralnorm stimmt mit dem größten *Eigenwert* der Matrix überein.

Eine Matrixnorm und eine Vektornorm heißen zueinander *kompatibel* (bzw. auch *verträglich*), falls

$$\underbrace{\|\hat{A} \cdot \vec{v}\|}_{\text{Vektornorm}} \leq \underbrace{\|\hat{A}\|}_{\text{Matrixnorm}} \cdot \underbrace{\|\vec{v}\|}_{\text{Vektornorm}} \quad \forall \vec{v} \in \mathbb{K}^N, \hat{A} \in \mathbb{K}^{N \times N}$$

- Eine komplexe quadratische Matrix  $\hat{A} \in \mathbb{C}^{N \times N}$ , deren Zeilen- und Spaltenvektoren orthonormal bzgl. des Standardskalarproduktes sind, heißt *unitär*. Aus der Definition folgt, dass die Inverse einer unitären Matrix durch ihre Adjungierte gegeben ist ( $\hat{A}^{-1} = \hat{A}^\dagger$ ). Daraus folgt wiederum, dass für den Betrag der Determinante einer unitären Matrix gilt:  $\det(\hat{A}) = 1$  und dass die Inverse einer unitären Matrix wieder unitär ist. Wird ein Vektor mit einer unitären Matrix multipliziert, so ändert sich dadurch die euklidische Norm des Vektors nicht. Wird eine Matrix mit einer unitären Matrix multipliziert, so bleibt deren Spektralnorm und Frobeniusnorm erhalten. Die Spektralnorm einer unitären Matrix selbst beträgt immer 1.
- Sind bei der Lösung des Gleichungssystems (A.1), die gemessenen Werte  $\vec{y}$  mit Fehlern  $\delta\vec{y}$  behaftet, so gilt bei einer mit der Vektornorm  $\|\vec{y}\|$  kompatiblen Matrixnorm die Ungleichung

$$\frac{\|\delta\vec{x}\|}{\|\vec{x}\|} \leq K \cdot \frac{\|\delta\vec{y}\|}{\|\vec{y}\|} \quad (\text{A.3})$$

Die Größe  $K$  heißt *Konditionszahl* oder auch *Kondition* der Matrix  $\hat{A}$  und bestimmt bei der Lösung von (A.1) die Fehlerfortpflanzung der Messfehler in die Auswertung. Sie ist definiert als

$$K := \|\hat{A}\| \cdot \|\hat{A}^{-1}\| \quad (\text{A.4})$$

Es gilt  $K \geq 1$  unabhängig von der verwendeten Norm. Wählt man die Spektralnorm als Matrixnorm für die Berechnung der Konditionszahl, so nimmt für unitäre Matrizen die Konditionszahl ihren minimalen Wert von 1 an. Ist  $\hat{A}$  eine unitäre Matrix und die gewählte Norm die euklidische Norm, so ist  $|\vec{x}| = |\vec{y}|$  und  $|\delta\vec{x}| = |\delta\vec{y}|$ .

- Fourier- Transformation: Eine wichtige Grundlage für diese Arbeit ist die Fourier-Transformation. Sie wird in diskreter und kontinuierlicher Form verwendet:

– kontinuierliche Fourier-Transformation der Funktion  $f(\vec{x})$  in  $N$  Dimensionen:

$$\begin{aligned} \mathcal{F}(f)(\vec{k}) = \underbrace{\tilde{f}(k_x, k_y, k_z)}_{\vec{k}} &= \frac{1}{(2\pi)^N} \int_{\mathbb{R}^N} e^{-i\vec{k}\vec{x}} f(\vec{x}) d^n x \\ \underbrace{f(x, y, z)}_{\vec{x}} &= \int_{\mathbb{R}^N} e^{i\vec{k}\vec{x}} \tilde{f}(\vec{k}) d^n k \end{aligned} \quad (\text{A.5})$$

Die Frequenzen  $\vec{k}$  können gemäß  $|\vec{k}| = 2\pi/p$  in Perioden umgerechnet werden. In dieser Arbeit ist die Rückwärtstransformation unnormiert.



---

– diskrete Fourier-Transformation in einer Dimension:

$$\begin{aligned}\tilde{f}(k) &= \tilde{f}_k = \frac{1}{N} \sum_{m=0}^{N-1} e^{-i\frac{2\pi}{N}km} f_m \\ f(m) &= f_m = \sum_{k=0}^{N-1} e^{i\frac{2\pi}{N}km} \tilde{f}_k\end{aligned}\quad (\text{A.6})$$

$N$  bezeichnet die Anzahl der gemessenen Werte  $f_m$ . Es gilt hier  $k, m \in \mathbb{Z}$ . Aufgrund der gewählten Normierung, entspricht der Wert von  $\tilde{f}(k=0)$  gerade dem Mittelwert der Werte von  $f(m)$ .

Die Messwerte  $f_m$  können als Vektor „ $\vec{f}$ “ aufgefasst und die diskrete Fouriertransformation als Matrixmultiplikation geschrieben werden:

$$\begin{aligned}\tilde{f}_k &= \sum_{m=1}^N w_{k,m} f_m \\ \text{bzw. kurz: } \vec{\tilde{f}} &= \hat{W} \cdot \vec{f}\end{aligned}\quad (\text{A.7})$$

wobei  $\hat{W} := (w)_{k,m} = \frac{1}{N} \exp(-i\frac{2\pi}{N}(k-1)(m-1))$ . Die inverse Matrix von  $\hat{W}$  liefert dementsprechend die Rücktransformation. Es gilt

$$\hat{W}^{-1} := (w^{-1})_{k,m} = \exp\left(i\frac{2\pi}{N}(k-1)(m-1)\right) = N\hat{W}^* = N\hat{W}^\dagger \quad (\text{A.8})$$

Die Matrix  $\hat{W}$  ist daher bis auf einen konstanten Faktor eine unitäre Matrix. Für die Konditionszahl  $K$  von  $\hat{W}$  bzgl. der Spektralnrm gilt daher  $K = 1$ .

- Die Matrix  $\hat{W}$ , die die diskrete Fouriertransformation vermittelt, ist wie ihre Inverse in Gleichung (A.8) bis auf einen konstanten Faktor unitär. Aus der Orthogonalität der ersten und  $k$ -ten Zeile von  $\hat{W}^\dagger$  folgt unmittelbar

$$\begin{aligned}\sum_{m=0}^{N-1} e^{im \cdot (k-1) \frac{2\pi}{N}} &= 0 \quad \forall k \in \{2, \dots, N\} \subset \mathbb{Z} \\ \Rightarrow \sum_{m=1}^N e^{im \cdot k \frac{2\pi}{N}} &= 0 \quad \forall k \in \{1, \dots, N-1\} \subset \mathbb{Z}\end{aligned}\quad (\text{A.9})$$

- Der *Träger* einer Funktion  $f(x) : \mathcal{A} \mapsto \mathbb{R}$  (oder auch engl. *support* bzw. kurz *supp*) bezeichnet die abgeschlossene Hülle der Teilmenge des Definitionsbereichs  $\mathcal{A}$ , in der die Funktion von null verschiedene Werte annimmt, also

$$\text{supp}(f) = \overline{\{x \in \mathcal{A} | f(x) \neq 0\}} \quad .$$

- Die Rechtecksfunktion ist in dieser Arbeit definiert als

$$\text{rect}(x) := \begin{cases} 1 & \text{falls } |x| \leq \frac{1}{2} \\ 0 & \text{sonst.} \end{cases}$$

- Die Fourier-Transformierte der Rechtecksfunktion ist die sinc-Funktion, welche in dieser Arbeit folgendermaßen definiert ist:

$$\text{sinc}(x) := \begin{cases} \frac{\sin(x)}{x} & \text{falls } |x| > 0 \\ 1 & \text{sonst.} \end{cases}$$

- Die zweidimensionale Verallgemeinerung der Rechtecksfunktion ist die Kreisfunktion:

$$\text{circ}(\vec{x}) = \begin{cases} 1 & \text{falls } |\vec{x}| \leq \frac{1}{2} \\ 0 & \text{sonst.} \end{cases}$$

- Die Fouriertransformierte der Kreisfunktion  $\text{circ}(|\vec{x}|)$  ist gegeben durch die sog. jinc-Funktion:

$$\text{jinc}(x) := \begin{cases} 2 \frac{J_1(x)}{x} & \text{falls } |x| > 0 \\ 1 & \text{sonst.} \end{cases},$$

wobei  $J_1(x)$  die Besselfunktion erster Art erster Ordnung bezeichnet. Allgemein werden die Besselfunktionen erster Art  $\nu$ -ter Ordnung mit  $J_\nu(x)$  abgekürzt. Für eine Kreisfunktion mit Radius  $r$ ,  $\text{circ}_r(|\vec{x}|) := \text{circ}(\frac{|\vec{x}|}{r})$  gilt:

$$\mathcal{F}(\text{circ}_r)(|\vec{k}|) = \frac{r^2 \pi}{4\pi^2} \text{jinc}(|\vec{k}|r)$$

- Die Faltung zweier Funktionen  $f(\vec{x}), g(\vec{x}) : \mathbb{R}^N \mapsto \mathbb{R}$  ist definiert als

$$(f * g)(\vec{x}) := \int_{\mathbb{R}^N} f(\vec{x}') g(\vec{x} - \vec{x}') d^n x'$$

- Mithilfe der Fourier-Transformation kann die Faltung als Produkt der Fourier-Transformierten geschrieben werden:

$$\mathcal{F}(f * g)(\vec{k}) = \tilde{f}(\vec{k}) \cdot \tilde{g}(\vec{k}) \quad (\text{A.10})$$

Diese Gleichung wird als *Faltungstheorem* bezeichnet.

- Die Besselfunktionen erster Art  $J_\nu(x)$  lassen sich folgendermaßen schreiben [Sch08, S.29]:

$$\begin{aligned}
J_\nu(x) &= \frac{1}{\pi} \int_0^\pi \cos(x \sin(\theta) - \nu\theta) d\theta = \\
&= \frac{1}{2\pi} \left[ \int_0^\pi e^{i[x \sin(\theta) - \nu\theta]} d\theta + \int_0^\pi e^{-i[x \sin(\theta) - \nu\theta]} d\theta \right] = \\
&= \frac{1}{2\pi} \left[ \int_0^\pi e^{i[x \sin(\theta) - \nu\theta]} d\theta + \int_{-\pi}^0 e^{i[x \sin(\theta) - \nu\theta]} d\theta \right] = \\
&= \frac{1}{2\pi} \int_{-\pi}^\pi e^{i[x \sin(\theta) - \nu\theta]} d\theta = \frac{1}{2\pi} (-1)^\nu \int_0^{2\pi} e^{-i[x \sin(\theta) + \nu\theta]} d\theta
\end{aligned}$$

Speziell für  $\nu = 0$  folgt daraus eine Integraldarstellung der Besselfunktion erster Art nullter Ordnung:

$$J_0(x) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} e^{-ix \sin(\theta)} d\theta \quad (\text{A.11})$$

- Für die Besselfunktionen erster Art gilt folgende Rekursionsrelation [Sch08, S.63]:

$$\frac{d}{dx} (x^\nu J_\nu(x)) = x^\nu J_{\nu-1}(x) \quad ,$$

wobei  $\nu \in \mathbb{Z}$ . Speziell für  $\nu = 1$  ergibt sich:

$$\frac{d}{dx} (x J_1(x)) = x J_0(x) \Rightarrow \int_a^b x J_0(x) dx = [x J_1(x)]_a^b \quad (\text{A.12})$$

- Sei  $f : \Omega \subseteq \mathbb{R}^n \mapsto \mathbb{R}^n$  eine beliebig oft differenzierbare reelle Funktion ( $f \in C^\infty(\Omega)$ ), dann bezeichnet

$$\delta(f) = \int_\Omega \delta(x) f(x) dx = f(0)$$

die sogenannte *Delta-Distribution*. Obwohl sie nicht durch eine Funktion darstellbar ist (aber als Limes von Funktionen, siehe z.B. [For99, S.176ff]), wird sie auch als *Dirac-Funktion* bzw. auch als  *$\delta$ -Funktion* bezeichnet. In zwei Dimensionen wird die Schreibweise  $\delta(\vec{x}) := \delta(x)\delta(y)$  benutzt.

- Eine Summe von Delta-Distributionen

$$\text{comb}_p(x) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \delta(x - np) \quad (\text{A.13})$$

wird als *Dirac-Kamm* bezeichnet. Die Fouriertransformation des Dirac-Kamms ergibt wieder einen Dirac-Kamm:

$$\mathcal{F}(\text{comb}_p)(k) := \frac{1}{2\pi p} \sum_{n=-\infty}^{\infty} \delta\left(k - n\frac{2\pi}{p}\right) = \frac{1}{2\pi p} \text{comb}_{\frac{2\pi}{p}}(k)$$

Dementsprechend lässt sich der Dirac-Kamm auf zwei Dimensionen verallgemeinern:

$$\begin{aligned} \text{comb}_{p_x, p_y}^2 &:= \sum_{m=-\infty}^{\infty} \sum_{n=-\infty}^{\infty} \delta(x - mp_x) \delta(y - np_y) \\ \Rightarrow \mathcal{F}(\text{comb}_{p_x, p_y}^2)(k_x, k_y) &= \frac{1}{4\pi^2 p_x p_y} \text{comb}_{\frac{2\pi}{p_x}, \frac{2\pi}{p_y}}^2(k_x, k_y) \end{aligned} \quad (\text{A.14})$$

## B. Die SIM-Konfokalitätsfunktion

Bei einer inkohärenten Abbildung des SIM-Musters auf die Probe, ist der Kontrastverlauf des Musterbildes in der Probe als Funktion von  $z$  entsprechend Abschnitt 2.4.5 durch den Verlauf der Anregungs-OTF  $O^{(\text{exc.})}(\vec{k}_\perp, z)$  für die Musterfrequenz  $\vec{k}_g$  gegeben.

Geht man zunächst von einer gleichmäßigen Ausleuchtung der Probe aus ( $I^{(\text{exc.})}(x, y, z) \equiv \text{const.}$ ) und nimmt als mikroskopisches Objekt eine unendlich dünne, gleichmäßig fluoreszierende Farbstoffschicht an ( $S(\vec{x}) = \delta(z)$ ), so erhält man bei der Aufnahme eines  $z$ -Stapels für die detektierte Intensität  $I^{(\text{det.})}$ :

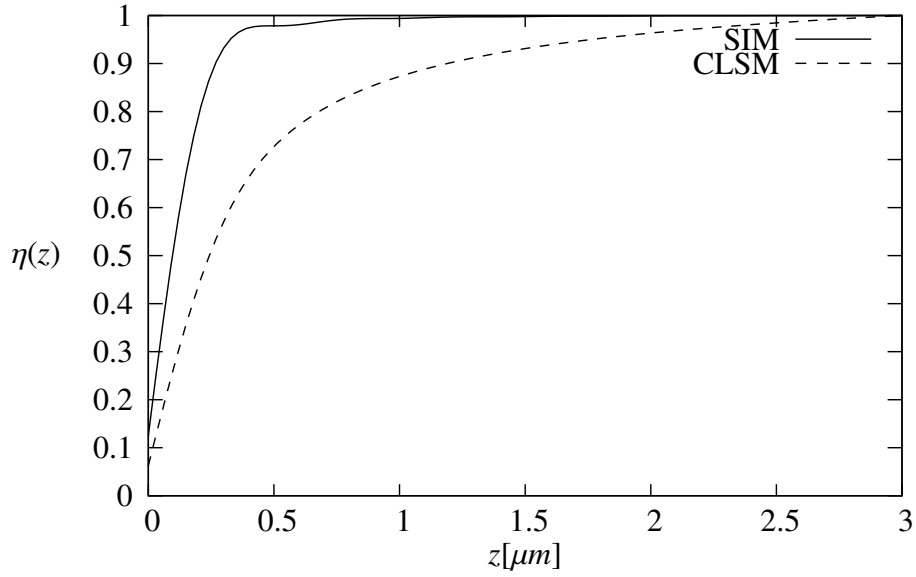
$$\begin{aligned} I^{(\text{det.})}(x, y, z) &= (h * S)(\vec{x}) = \\ &= \iiint d^3x' h(\vec{x}_\perp - \vec{x}'_\perp, z - z') \delta(z') = \\ &= \iint dx' dy' h(\vec{x}_\perp - \vec{x}'_\perp, z) = \mathcal{K}_{\text{EPI}}(z) \equiv 1 \end{aligned} \quad (\text{B.1})$$

Aufgrund dessen kann die Konfokalitätsfunktion wie in Abschnitt 3.1 erläutert durch die Aufnahme eines  $z$ -Stapels durch eine möglichst dünne und möglichst gleichmäßig fluoreszierende Farbstoffschicht [Bra04] für alle Punkte  $\vec{x}_\perp$  des Bildfeldes gemessen werden.

Geht man wie in Abschnitt 3.2 von strukturierter Beleuchtung mit einer Gitterfrequenz von  $\nu_g = 1$  (bzw.  $p = \lambda/\text{NA}$ ) aus, so ergibt sich für die Intensität (des  $m$ -ten Rohbilds) in der Ebene des Objekts:

$$I_m^{(\text{em.})}(\vec{x}) = \delta(z) I_0 \underbrace{[O_{(\text{exc.})}(\vec{k}_\perp = 0, z) + O_{(\text{exc.})}(\vec{k}_\perp = \vec{k}_g, z) \cos(\vec{k}_g \vec{x}_\perp + \Phi_0 - \alpha_m)]}_{\equiv 1}$$

Hierbei ist  $I_0$  die mittlere Intensität der Anregung. Die in der Bildebene des Mikroskops detektierte Intensität  $I^{(\text{det.})}(\vec{x})$  ergibt sich aus der Faltung der emittierten Intensität  $I^{(\text{em.})}$  mit der PSF des Emissionsstrahlenganges. Da das Objekt in allen Richtungen der  $(x, y)$ -Ebene nur



**Abb. B.1.:** Vergleich der Konfokalität eines CLSM und eines SIM-Mikroskops mit der in Gleichung (3.5) definierten Funktion  $\eta(z)$ .

aus einer einzelnen Frequenz (der Nullfrequenz) besteht, und somit die emittierte Intensität nur die Nullfrequenz und die Gitterfrequenz enthält, erhält man:

$$\begin{aligned}
 I_m^{(\text{det.})} &= (h * I^{(\text{em.})})(\vec{x}) = \\
 &\stackrel{(\text{B.1})}{=} I_0 \underbrace{[\mathcal{K}_{\text{EPI}}(z)]}_{\equiv 1} + \underbrace{O_{(\text{exc.})}(\vec{k}_\perp = \vec{k}_g, z) \cdot O_{(\text{em.})}(\vec{k}_\perp = \vec{k}_g, z)}_{\mathcal{K}_{\text{SIM}}} \cos(\vec{k}_g \cdot \vec{x}_\perp + \Phi_0 - \alpha_m)
 \end{aligned}$$

Vernachlässigt man die Stokes-Verschiebung, so erhält man näherungsweise für die Konfokalitätsfunktion der SIM Mikroskopie [Wil11]:

$$\mathcal{K}_{\text{SIM}}(z) = \left( O(\vec{k}_\perp = \vec{k}_g, z) \right)^2$$

Diese Gleichung wurde zur Berechnung der SIM Konfokalitätsfunktion in Abbildung 3.6 benutzt. Wie in Abschnitt 3.2 erläutert, ist die Halbwertsbreite der Konfokalitätsfunktion zur Quantifizierung der Konfokalität eines Mikroskops nicht gut geeignet. Die in Gleichung (3.5) definierte Größe  $\eta(z)$  ist zum Vergleich mehrerer konfokaler Mikroskope deutlich aussagekräftiger. Die dem Beispiel in Abbildung 3.6 entsprechenden Funktionen  $\eta(z)$  sind in Abbildung B.1 dargestellt.

Im Falle kohärenter Anregung ergibt sich die Konfokalitätsfunktion  $\mathcal{K}_{\text{SIM}}(z)$  durch das Produkt aus dem normierten Kontrastverlauf des SIM Musters in  $z$ -Richtung mit dem Verlauf der Emissions-OTF der Musterfrequenz  $O_{(\text{em.})}(\vec{k}_\perp = \vec{k}_g, z)$  in  $z$ -Richtung.

## C. Herleitung der PSF eines Laserscanning-Mikroskops

In den folgenden beiden Abschnitten werden die PSFs für ein Laserscanning-Mikroskop mit punktförmiger bzw. linienförmiger Anregung erläutert. Im Fall der punktförmigen Anregung wird davon ausgegangen, dass der punktförmig angeregte Bereich auf eine konfokale Blende abgebildet wird. Jeder Abtastposition wird ein Bildpunkt zugeordnet, wobei die detektierte Intensität über die Fläche der konfokalen Blende integriert wird.

Im Fall des linienkonfokalen Mikroskops wird angenommen, dass die Emission auf einer Kamera mit *Rolling Shutter* detektiert wird, wobei die Position/die Bewegung des Rolling Shutters gerade mit der Position/Bewegung der Anregungslinie synchronisiert ist. Hier wird jedem Punkt der Kamera ein Bildpunkt zugeordnet, wobei die Intensitäten innerhalb des Rolling-Shutter Bereiches über die Scanpositionen der Linie bzw. des Rolling-Shutters integriert wird.

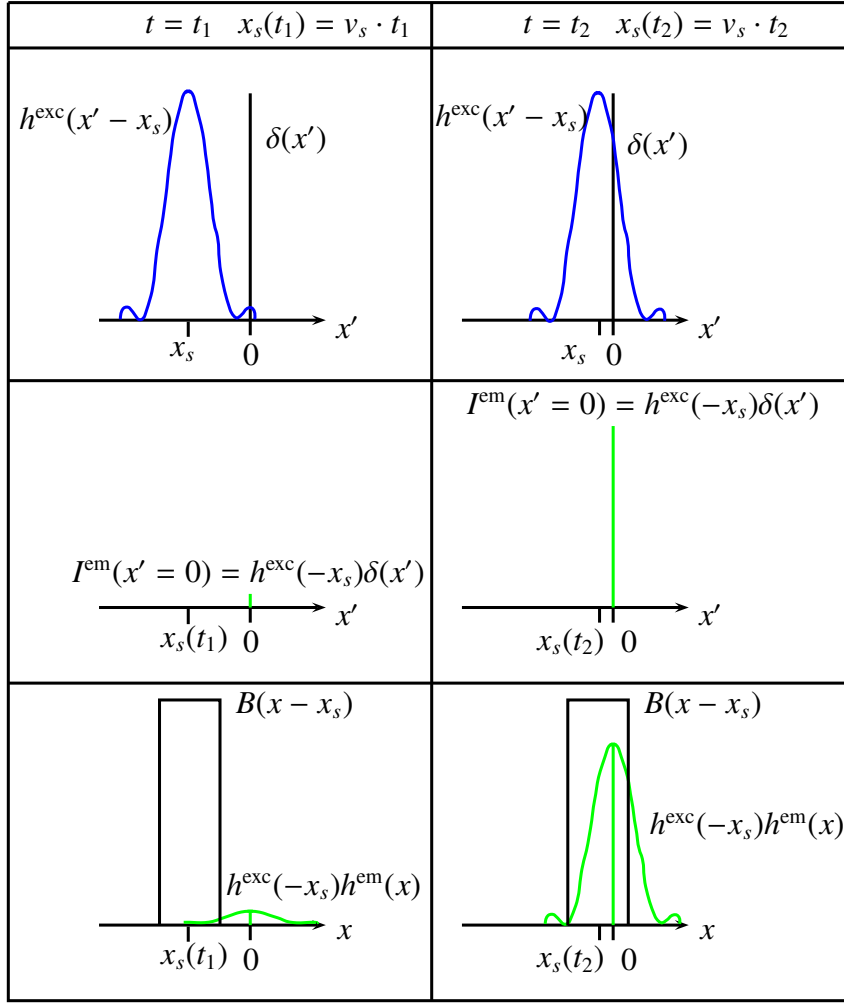
### C.1. Laserscanning mit punktförmiger Anregung

In Abbildung C.1 sind die wesentlichen Schritte der Herleitung der PSF eines CLSM in einer Dimension grafisch illustriert.

Zunächst nimmt man als Objektfunktion  $S(\vec{x'})$  eine Punktlichtquelle (bzw. genauer einen einzelnen anregbaren Punkt) im Zentrum des Objektkoordinatensystems  $\vec{x'} = (x', y', z')^t$  an:

$$S(\vec{x'}) = \delta(\vec{x'})$$

Die Anregung erfolgt in Form der Anregungs-PSF  $h^{\text{exc.}}(\vec{x'}_{\perp} - \vec{x}_s)$ , welche sich immer an der gegenwärtigen Scanposition  $\vec{x}_s(t) = (x_s(t), y_s(t))^t$  befindet. Die erste Zeile in Abbildung C.1 zeigt die Situation zu zwei Zeitpunkten  $t_1$  und  $t_2$ , welche zwei Scanpositionen entsprechen.



**Abb. C.1.:** Grafische Darstellung zur Herleitung der PSF des Laserscanningmikroskops.

Daraus ergibt sich (siehe die zweite Zeile in Abbildung C.1) für eine bestimmte Scanposition  $\vec{x}_s$  die Intensität der Emission

$$\underbrace{I^{\text{em.}}(\vec{x}'_{\perp}, \vec{x}_s, z')}_{I^{\text{em.}}(\vec{x}', t)} = h^{\text{exc.}}(\vec{x}'_{\perp} - \vec{x}_s, z')\delta(\vec{x}') \quad .$$

Das Signal in der Blendenebene ist dann gegeben durch die Faltung mit der Emissions-PSF:

$$\begin{aligned} I^{\text{det}}(\vec{x}_{\perp}, \vec{x}_s, z) &= [I^{\text{em.}} * h^{\text{em.}}](\vec{x}) \\ &= \int d^3 x' h^{\text{exc.}}(\vec{x}'_{\perp} - \vec{x}_s, z')\delta(\vec{x}')h^{\text{em.}}(\vec{x} - \vec{x}') \end{aligned} \quad (\text{C.1})$$

Hierbei bezeichnet  $\vec{x}$  das Koordinatensystem im (Zwischen-)Bild bzw. in der Ebene der konfokalen Detektionsblende  $B(\vec{x}_{\perp})$ . Das Koordinatensystem  $(\vec{x} - \vec{x}')$  ist das Koordinatensystem des Mikroskopobjektivs für den Emissionsstrahlengang. Das Bild der konfokalen Blende in



der Probe hat sein Zentrum immer im Punkt  $\vec{x}'_{\perp} = \vec{x}_s$ . Daher ist die konfokale Blende in der Zwischenbildebene eine Funktion von  $\vec{x}_{\perp} - \vec{x}_s$ :

$$I^{\text{det}}(\vec{x}, \vec{x}_s, z) = B(\vec{x}_{\perp} - \vec{x}_s) \cdot \int d^3 x' h^{\text{exc.}}(\vec{x}'_{\perp} - \vec{x}_s, z') \delta(\vec{x}') h^{\text{em.}}(\vec{x} - \vec{x}')$$

D.h. die konfokale Blende befindet sich immer an der Scanposition  $\vec{x}_s$ . Üblicherweise wird bei Verwendung einer Blende, die fluoreszente Emission über denselben Scanspiegel abgebildet wie der Anregungsfokus. Somit wird die Anregungs-PSF immer auf den gleichen Punkt in der Zwischenbildebene abgebildet. Man spricht in diesem Fall von *Descanned Detection*. Dies entspricht einer Koordinatentransformation  $\vec{x}_{\perp} \mapsto \vec{x}_{\perp} + \vec{x}_s$ :

$$I^{\text{det}}(\vec{x}, \vec{x}_s, z) = B(\vec{x}_{\perp}) \cdot \int d^3 x' h^{\text{exc.}}(\vec{x}'_{\perp} - \vec{x}_s, z') \delta(\vec{x}') h^{\text{em.}}(\vec{x}_{\perp} + \vec{x}_s - \vec{x}'_{\perp}, z - z') \quad (\text{C.2})$$

Gleichung (C.2) beschreibt die dreidimensionale Verteilung der Intensität um die Zwischenbildebene. Bei der Aufnahme eines  $z$ -Stapels werden bei verschiedenen Objektivpositionen  $z$  mikroskopische Bilder gespeichert. Die  $z$ -Positionen des Objektivs entsprechen dann der  $z$ -Koordinate im Bildstapel. Da die Anregungs-PSF mit demselben Objektiv erzeugt wird durch die auch die Emission auf die Probe abgebildet wird, befindet sich die Anregungs-PSF  $h^{\text{exc.}}(\vec{x}'_{\perp} - \vec{x}_s, z')$  bzgl. der  $z'$ -Koordinate relativ zum Objektiv immer an derselben Position. In Gleichung (C.2) muss also  $h^{\text{exc.}}(\vec{x}'_{\perp} - \vec{x}_s, z')$  ersetzt werden durch  $h^{\text{exc.}}(\vec{x}'_{\perp} - \vec{x}_s, z - z')$ :

$$\begin{aligned} I^{\text{det}}(\vec{x}, \vec{x}_s, z) &= B(\vec{x}_{\perp}) \cdot \int d^3 x' h^{\text{exc.}}(\vec{x}'_{\perp} - \vec{x}_s, z - z') \delta(\vec{x}') h^{\text{em.}}(\vec{x}_{\perp} + \vec{x}_s - \vec{x}'_{\perp}, z - z') = \\ &= B(\vec{x}_{\perp}) h^{\text{exc.}}(-\vec{x}_s, z) h^{\text{em.}}(\vec{x}_{\perp} + \vec{x}_s, z) \end{aligned}$$

Der letzte Schritt zur Berechnung der PSF eines CLSM ist in der dritten Zeile von Abbildung C.1 gezeigt. Das gesamte Signal, welches sich innerhalb des Trägers der konfokalen Emissionsblendenfunktion  $B(\vec{x}_{\perp})$  befindet, wird aufintegriert und der Koordinate  $x_s$  zugeordnet:

$$h_{\text{CLSM}}(\vec{x}_s, z) = h^{\text{exc.}}(-\vec{x}_s, z) \cdot \underbrace{\int d^2 x_{\perp} B(\vec{x}_{\perp}) h^{\text{em.}}(\vec{x}_{\perp} + \vec{x}_s, z)}_{(B * h^{\text{em.}})(\vec{x}_s)} \quad (\text{C.3})$$

Vernachlässigt man die Stokes-Verschiebung zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge, so ergibt sich hier im Grenzwert einer unendlich kleinen Blendenfunktion  $B(x) \rightarrow \delta(x)$  das Quadrat der Epifluoreszenz-PSF. Aus Gleichung (C.3) folgt für die OTF eines Laserscanningmikroskops:

$$\begin{aligned} O_{\text{CLSM}}(\vec{k}_{\perp}, z) &= ((\tilde{B} \cdot O_{\text{em.}}) * O_{\text{exc.}}^*)(\vec{k}_{\perp}, z) \\ &= \int d^2 \vec{k}'_{\perp} \tilde{B}(\vec{k}'_{\perp}) O_{\text{em.}}(\vec{k}'_{\perp}, z) O_{\text{exc.}}^*(\vec{k}_{\perp} - \vec{k}'_{\perp}, z) \end{aligned} \quad (\text{C.4})$$

## C.2. PSF für ein linienkonfokales Mikroskop

In dieser Arbeit wird das Verfahren der strukturierten Beleuchtung mit linienkonfokaler Mikroskopie kombiniert. Im Folgenden wird erläutert, wie man die PSF eines linienkonfokalen Mikroskops berechnet. Im Gegensatz zur punktförmigen Anregung wird der Kamera Rolling-Shutter als konfokale Blende genutzt. Falls man wie im letzten Abschnitt ein punktförmiges mikroskopisches Objekt  $\delta(\vec{x})$  annimmt, erhält man für die emittierte Intensität

$$I^{\text{em.}}(\vec{x}, y_s, z') = L^{\text{exc.}}(y' - y_s, z') \cdot \delta(\vec{x}) \quad ,$$

wobei  $L^{\text{exc.}}(y' - y_s, z')$  das Linienprofil der Anregungsintensität und  $y_s$  die Scanposition der Anregungslinie ist. Die Intensität in der Ebene der Kamera ergibt sich aus der emittierten Intensität  $I^{\text{em.}}$  durch Faltung mit der Emissions-PSF  $h^{\text{em.}}$  des Mikroskops:

$$\begin{aligned} I^{\text{det.}}(\vec{x}, y_s) &= [I^{\text{em.}} * h^{\text{em.}}](\vec{x}) = \\ &= \int d^3x' L^{\text{exc.}}(y' - y_s, z') \delta(\vec{x}') h^{\text{em.}}(\vec{x} - \vec{x}') = \end{aligned} \quad (\text{C.5})$$

Wie im vorherigen Abschnitt ist zu beachten, dass bei einem  $z$ -Stapel nicht die Kameraebene, sondern das Objektiv in  $z$ -Richtung verschoben wird und dass sich durch die Verschiebung des Objektivs auch die Position der Anregungslinie in  $z$ -Richtung ändert. Mit anderen Worten: Das Maximum der Anregungslinie befindet im Koordinatensystem des Objektivs immer an derselben  $z$ -Position. Daher muss das Linienprofil in Gleichung (C.5) durch  $L^{\text{exc.}}(y' - y_s, z - z')$  ersetzt werden:

$$\begin{aligned} I^{\text{det.}}(\vec{x}, y_s) &= \int d^3x' L^{\text{exc.}}(y' - y_s, z - z') \delta(\vec{x}') h^{\text{em.}}(\vec{x} - \vec{x}') = \\ &= L^{\text{exc.}}(-y_s, z) h^{\text{em.}}(\vec{x}) \end{aligned} \quad (\text{C.6})$$

Die Intensität in der Detektionsebene  $I^{\text{det.}}$  wird nur innerhalb des aktiven Bereichs des Rolling-Shutters detektiert, d.h. die tatsächlich detektierte Intensität für eine Scanposition  $y_s$  ist gegeben durch das Produkt von (C.6) mit der Blendenfunktion  $B^{\text{RS}}$  des Rolling-Shutters. Die linienkonfokale PSF ergibt sich schließlich durch Integration aller Linien- bzw. Rolling-Shutter Positionen  $y_s$ :

$$h_{\text{SK}}(\vec{x}) = \int dy_s I^{\text{det.}}(\vec{x}, y_s) = \int dy_s B^{\text{RS}}(y - y_s) \cdot \underbrace{L^{\text{exc.}}(-y_s, z)}_{=L^{\text{exc.}}(y_s, z)} h^{\text{em.}}(\vec{x}) = h^{\text{em.}}(\vec{x}) \cdot (B^{\text{RS}} * L^{\text{exc.}})(y, z) \quad (\text{C.7})$$

Die linienkonfokale PSF ist also aus dem Produkt der Epifluoreszenz PSF  $h^{\text{em.}}$  mit der Faltung aus Anregungslinie  $L^{\text{exc.}}$  und Rolling-Shutter-Blende  $B^{\text{RS}}$  gegeben, wobei die Faltung ( $B^{\text{RS}} * L^{\text{exc.}}$ ) nur in  $y$ -Richtung ausgeführt wird. Aus (C.7) ergibt sich unmittelbar die OTF  $O_{\text{SK}}(k_x, k_y, z)$  für ein linienkonfokales Mikroskop:

$$O_{\text{SK}}(k_x, k_y, z) = \int dk'_y \tilde{B}^{\text{RS}}(k'_y) \tilde{L}^{\text{exc.}}(k'_y, z) O_{\text{em.}}(k_x, k'_y - k_y, z) \quad (\text{C.8})$$

Setzt man in Gleichung (C.8)  $k_x = k_y = 0$ , so erhält man direkt die Konfokalitätsfunktion für ein linienkonfokales Mikroskop:

$$\mathcal{K}_{\text{SK}}(z) = \int dk'_y \tilde{B}^{\text{RS}}(k'_y) \tilde{L}^{\text{exc.}}(k'_y, z) O_{\text{em.}}(0, k'_y, z) \quad (\text{C.9})$$



## D. Herleitung der Gleichungen (3.13), (4.24) und (4.45)

### D.1. Reelle Auswertung für quasikonfokale SIM mit Linienmuster

Bei der inkohärenten strukturierten Beleuchtung mit Liniengitter ist ein Rohbild bei geeigneter Wahl der Gitterfrequenz wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, näherungsweise gegeben durch

$$I_m = \underbrace{I^{(0)}}_{\text{Hintergrundsignal}} + \underbrace{I^{(1)}}_{\text{Infokus-Signal}} \cos(\underbrace{\vec{k}_1}_{\text{Gitterfrequenz}} \cdot \vec{x} - \alpha_m^{(1)}) = I^{(0)} + I^{(1)} \Re \left( e^{i\vec{k}^{(1)} \cdot \vec{x}} e^{-i\alpha_m^{(1)}} \right) , \quad (\text{D.1})$$

wobei  $\alpha_m^{(1)}$  durch die relative Verschiebung  $\vec{\Delta}$  durch  $\alpha_m^{(1)} = \vec{k}^{(1)} \cdot \vec{\Delta}$  gegeben ist. Die paarweise Differenz zweier Rohbilder ist dementsprechend

$$(I_m - I_n) = I^{(1)} \Re \left[ e^{i\vec{k}^{(1)} \cdot \vec{x}} \left( e^{-i\alpha_m^{(1)}} - e^{-i\alpha_n^{(1)}} \right) \right] . \quad (\text{D.2})$$

Es bezeichne  $N$  die minimale notwendige Zahl an Gleichungen, die für die Lösung von  $I^{(1)}$  in Gleichung (D.1) benötigt werden. Diese ist in der Regel immer ungerade. Sie hängt von der Periode des Linienmusters und der  $NA$  ab. Für die Phasenverschiebung der Modulation  $\alpha_m^{(1)}$  kann man annehmen, dass

$$\alpha_m^{(1)} = m \frac{2\pi}{N} \quad (\text{D.3})$$

$$\alpha_n^{(1)} = n \frac{2\pi}{N} \quad (\text{D.4})$$

$$n = m + \delta$$

$$\Rightarrow (e^{-i\alpha_m^{(1)}} - e^{-i\alpha_n^{(1)}}) = e^{-im\frac{2\pi}{N}} - e^{-im\frac{2\pi}{N}} e^{-i\delta\frac{2\pi}{N}} = e^{-im\frac{2\pi}{N}} (1 - e^{-i\delta\frac{2\pi}{N}})$$

mit  $m, n, \delta \in \mathbb{F}_N$ .

Weiterhin gilt für  $z \in \mathbb{C}$ :

$$[\Re(z)]^2 = \left[ \frac{1}{2}(z + \bar{z}) \right]^2 = \frac{1}{4} [z^2 + \bar{z}^2 + z\bar{z} + \bar{z}z] = \frac{1}{2} [\Re(z^2) + |z|^2] \quad (\text{D.5})$$

Quadriert man Gleichung (D.2), so erhält man unter Verwendung von (D.5)

$$(I_m - I_n)^2 = (I^{(1)})^2 \left\{ \frac{1}{2} \Re \left[ e^{i2\vec{k}_1 \cdot \vec{x}} \left( \underbrace{e^{-i2\alpha_m^{(1)}}}_{e^{-im\frac{4\pi}{N}}} + \underbrace{e^{-i2\alpha_n^{(1)}}}_{e^{-in\frac{4\pi}{N}}} - 2e^{-i(\alpha_m^{(1)} + \alpha_n^{(1)})} \right) \right] + \left( 1 - \cos \left( \frac{\delta 2\pi}{N} \right) \right) \right\} \quad (\text{D.6})$$

Daraus folgt für die Summe der quadratischen paarweisen Differenzen:

$$\begin{aligned} \sum_1^N (I_m - I_{m+\delta})^2 &= (I^{(1)})^2 \cdot \frac{1}{2} \Re \left[ e^{i2\vec{k}_1 \cdot \vec{x}} \left( \underbrace{\sum_{m=1}^N e^{-im\frac{4\pi}{N}}}_0 + e^{-i\delta\frac{4\pi}{N}} \underbrace{\sum_{m=1}^N e^{-im\frac{4\pi}{N}}}_0 - 2e^{-i\delta\frac{2\pi}{N}} \underbrace{\sum_{m=1}^N e^{-im\frac{4\pi}{N}}}_0 \right) \right] \\ &\quad + (I^{(1)})^2 N \left( 1 - \cos \left( \delta \frac{2\pi}{N} \right) \right) \end{aligned} \quad (\text{D.7})$$

$$\Rightarrow I^{(1)} = \frac{1}{\sqrt{N(1 - \cos(\delta \frac{2\pi}{N}))}} \sqrt{\sum_{m=1}^N (I_m - I_{m+\delta})^2} \quad (\text{D.8})$$

Die Summen in der ersten Zeile von Gleichung (D.7) geben aufgrund von Gleichung (A.9) im Anhang A 0. Aus der Gleichung (D.7) sieht man, dass das Signal, das sich aus der Summe der quadratischen paarweisen Differenzen der Rohbilder ergibt, von der Indexdifferenz  $\delta$  abhängt. Für  $\delta = 0$  verschwindet das Signal in Gleichung (D.7) und die Lösung in Gleichung (D.8) existiert nicht. Die maximale Signalstärke ergibt sich für das Maximum der Funktion  $(1 - \cos(\delta \frac{2\pi}{N}))$ , also für  $\delta = \frac{N}{2}$ . Da wie bereits geschrieben  $N$  i.d.R. eine ungerade Zahl ist, wird für  $\delta$  üblicherweise  $\delta = \lfloor \frac{N}{2} \rfloor$  oder  $\delta = \lceil \frac{N}{2} \rceil$  gewählt [Hei06a]. Speziell für  $N = 3$  und  $\delta = 1$  ergibt das [Nei97]

$$I^{(1)} = \frac{\sqrt{2}}{3} \sqrt{(I_1 - I_2)^2 + (I_2 - I_3)^2 + (I_3 - I_1)^2} \quad (\text{D.9})$$

## D.2. Reelle Auswertung für quasikonfokale SIM mit Schachbrettmuster

Bei inkohärenter strukturierter Beleuchtung mit Schachbrettmuster, ist wie in Abschnitt 4.1 ein Rohbild näherungsweise gegeben durch:

$$I_m = I^{(0)} + \Re \left[ I^{(1)} e^{i\vec{k}_1 \cdot \vec{x}} e^{-i\alpha_m^{(1)}} + I^{(2)} e^{i\vec{k}_2 \cdot \vec{x}} e^{-i\alpha_m^{(2)}} \right] \quad (\text{D.10})$$

Für die paarweisen Differenzen der Rohbilder  $I_m$  und  $I_n$  folgt daraus

$$(I_m - I_n) = \Re \left[ \underbrace{I^{(1)} e^{i\vec{k}_1 \vec{x}} \left( e^{-i\alpha_m^{(1)}} - e^{-i\alpha_n^{(1)}} \right)}_{=:z_1(m, \delta)} + \underbrace{I^{(2)} e^{i\vec{k}_2 \vec{x}} \left( e^{-i\alpha_m^{(2)}} - e^{-i\alpha_n^{(2)}} \right)}_{=:z_2(m, \delta)} \right] \quad (\text{D.11})$$

Wie beim Linienmuster kann man auch beim Schachbrett von den Gleichungen (D.3) und (D.4) ausgehen. Zusätzlich gilt beim Schachbrettmuster  $\alpha_m^{(2)} = \kappa \alpha_m^{(1)} \forall m$ . Daraus folgt für die in (D.11) definierten Größen  $z_1(m, \delta)$  und  $z_2(m, \delta)$ :

$$\begin{aligned} z_1(m, \delta) &= I^{(1)} e^{i\vec{k}_1 \vec{x}} \left( e^{-i\alpha_m^{(1)}} - e^{-i\alpha_n^{(1)}} \right) = I^{(1)} e^{i\vec{k}_1 \vec{x}} \left( 1 - e^{-i\delta \frac{2\pi}{N}} \right) e^{-im \frac{2\pi}{N}} \\ z_2(m, \delta) &= I^{(2)} e^{i\vec{k}_2 \vec{x}} \left( e^{-i\alpha_m^{(2)}} - e^{-i\alpha_n^{(2)}} \right) = I^{(2)} e^{i\vec{k}_2 \vec{x}} \left( 1 - e^{-i\kappa \delta \frac{2\pi}{N}} \right) e^{-im \kappa \frac{2\pi}{N}} \end{aligned}$$

Entsprechend Gleichung (D.5) in Abschnitt D.1 findet man hier

$$[\Re(z_1 + z_2)]^2 = \frac{1}{2} \left[ \Re(z_1)^2 + \Re(z_2)^2 + \Re(z_1 z_2) + \Re(\bar{z}_1 z_2) + |z_1|^2 + |z_2|^2 \right] \quad (\text{D.12})$$

Für die Summen der paarweisen Differenzen folgt daraus:

$$\begin{aligned} 2 \sum_{m=1}^N (I_m - I_n)^2 &= \underbrace{\sum_{m=1}^N \Re(z_1^2(m, \delta))}_0 + \underbrace{\sum_{m=1}^N \Re(z_2^2(m, \delta))}_0 + \\ &+ \underbrace{\sum_{m=1}^N \Re(z_1(m, \delta) z_2(m, \delta))}_0 + \underbrace{\sum_{m=1}^N \Re(\bar{z}_1(m, \delta) z_2(m, \delta))}_0 + \\ &+ \sum_{m=1}^N |z_1(m, \delta)|^2 + \sum_{m=1}^N |z_2(m, \delta)|^2 = \\ &= (I^{(1)})^2 \cdot 2N \left( 1 - \cos \left( \delta \frac{2\pi}{N} \right) \right) + (I^{(2)})^2 \cdot 2N \left( 1 - \cos \left( \kappa \delta \frac{2\pi}{N} \right) \right) \end{aligned}$$

Letztlich ergibt sich für die Summe der quadrierten paarweisen Differenzen der Rohbilder

$$\frac{1}{N} \sum_{m=1}^N (I_m - I_n)^2 = (I^{(1)})^2 \cdot \left( 1 - \cos \left( \delta \frac{2\pi}{N} \right) \right) + (I^{(2)})^2 \cdot \left( 1 - \cos \left( \kappa \delta \frac{2\pi}{N} \right) \right) \quad (\text{D.13})$$

Speziell für  $\kappa = 2$  und  $N = 5$  ergibt sich daraus für das quadratische Mittel aus  $I^{(1)}$  und  $I^{(2)}$ :

$$\sqrt{(I^{(1)})^2 + (I^{(2)})^2} = \frac{\sqrt{2}}{5} \sqrt{\sum_{\delta=1}^2 \sum_{m=1}^5 (I_m - I_{(m+\delta)})^2} \quad (\text{D.14})$$

### D.3. Reelle Auswertung für quasikonfokale SIM mit Hexagonmuster

Bei inkohärenter strukturierter Beleuchtung mit hexagonalen Mustern, lässt sich wie in Abschnitt 4.2 beschrieben, ein Rohbild  $I_m = I_m(x, y)$  näherungsweise schreiben als

$$I_m = I^{(0)} + \Re \left[ I^{(1)} e^{i\vec{k}_1 \vec{x}} e^{-i\alpha_m^{(1)}} + I^{(2)} e^{i\vec{k}_2 \vec{x}} e^{-i\alpha_m^{(2)}} + I^{(3)} e^{i\vec{k}_3 \vec{x}} e^{-i\alpha_m^{(3)}} \right] \quad (\text{D.15})$$

Wie in den vorherigen Abschnitten folgt für die paarweise Differenz zweier Rohbilder  $I_m$  und  $I_n$ :

$$(I_m - I_n) = \Re \left[ I^{(1)} e^{i\vec{k}_1 \vec{x}} \left( e^{-i\alpha_m^{(1)}} - e^{-i\alpha_n^{(1)}} \right) + I^{(2)} e^{i\vec{k}_2 \vec{x}} \left( e^{-i\alpha_m^{(2)}} - e^{-i\alpha_n^{(2)}} \right) + I^{(3)} e^{i\vec{k}_3 \vec{x}} \left( e^{-i\alpha_m^{(3)}} - e^{-i\alpha_n^{(3)}} \right) \right] \quad (\text{D.16})$$

Auch beim Hexagonmuster kann man (D.3) und (D.4) annehmen. Zusätzlich gilt für die Phasenverschiebungen  $\alpha_m^{(2)} = \kappa \alpha_m^{(1)}$  und  $\alpha_m^{(3)} = (\kappa + 1) \alpha_m^{(1)}$ . Für die Summe der quadratischen paarweisen Differenzen der Rohbilder folgt daraus:

$$\sum_{m=1}^N (I_m - I_n)^2 = (I^{(1)})^2 \cdot N \left( 1 - \cos \left( \delta \frac{2\pi}{N} \right) \right) \quad (\text{D.17})$$

$$+ (I^{(2)})^2 \cdot N \left( 1 - \cos \left( \kappa \delta \frac{2\pi}{N} \right) \right) \quad (\text{D.18})$$

$$+ (I^{(3)})^2 \cdot N \left( 1 - \cos \left( (\kappa + 1) \delta \frac{2\pi}{N} \right) \right) \quad (\text{D.19})$$

Speziell für  $N = 7$  und  $\kappa = 2$  ergibt sich hieraus für das quadratische Mittel aus  $I^{(1)}$ ,  $I^{(2)}$  und  $I^{(3)}$ :

$$\sqrt{(I^{(1)})^2 + (I^{(2)})^2 + (I^{(3)})^2} = \frac{\sqrt{2}}{7} \sqrt{\sum_{\delta=1}^3 \sum_{m=1}^7 (I_m - I_{m+\delta})^2} \quad (\text{D.20})$$



## E. Fehlerfortpflanzung bei quasikonfokaler SIM

In folgendem Abschnitt wird die Fehlerfortpflanzung bei der in den Abschnitten 3.2, 4.1 und 4.2 beschriebenen SIM Auswertung erläutert. Zunächst wird der Fall untersucht, dass die Matrix  $\hat{A}$  proportional zu einer unitären Matrix ist. Anschließend wird die Fehlerfortpflanzung der Auswertung untersucht, falls der in den Abschnitten 4.1 bzw. 4.2 beschriebene Orientierungswinkel des Verschiebevektors  $\vec{\Delta}$  einen Fehler aufweist.

Auf jeden Bildpunkt bezeichne  $y_m$  den gemessenen Intensitätswert im  $m$ -ten Rohbild und  $x^{(n)}$  die  $n$ -te unbekannte Größe des linearen Gleichungssystems. Sowohl die gemessenen als auch die unbekannten Größen können als Vektoren  $\vec{y}$  und  $\vec{x}$  interpretiert werden und dementsprechend kann die Lösung des linearen Gleichungssystems als Inversion der Matrix  $\hat{A}$  aufgefasst werden. (Im Gegensatz zum Rest dieser Arbeit bezeichnet  $\vec{x}$  in diesem Abschnitt nicht die räumliche Koordinate, sondern den Vektor der unbekannten Größen.) Wie in Anhang A erläutert, ist die Fehlerfortpflanzung bei der Lösung eines linearen Gleichungssystems

$$\vec{x} = \hat{A}^{-1} \vec{y}$$

durch die Konditionszahl  $K$  der Matrix  $\hat{A}$  gegeben. Sind die gemessenen Größen im Vektor  $\vec{y}$  mit einem additiven Fehler behaftet, d.h.  $\vec{x} \mapsto \vec{x} + \delta\vec{x}$ , so gilt für die Fehler der Auswertung

$$\delta\vec{y} = \hat{A}^{-1} \delta\vec{x} \quad .$$

Aus Gleichung (A.2) folgt, als Abschätzung für den Fehlervektor

$$\begin{aligned} |\delta\vec{x}| &\leq \|\hat{A}^{-1}\|_2 \cdot |\delta\vec{y}| \\ \Rightarrow |\delta\vec{x}|^2 &\leq \|\hat{A}^{-1}\|_2^2 \cdot |\delta\vec{y}|^2 \end{aligned} \tag{E.1}$$

Im Folgenden werden die Mittelwerte der Betragsquadrate in Gleichung (E.1) berechnet: Nimmt man an, dass der Mittelwert der Messfehler in  $\vec{y}$  über mehrere Messreihen verschwindet ( $\langle \delta\vec{y} \rangle = 0$ ), so ergibt sich für die Größe  $|\delta\vec{y}|^2$  im Mittel gerade die Summe der Varianzen

der gemessenen Größen  $y_m$ :

$$\langle |\delta \vec{y}|^2 \rangle = \sum_{m=1}^N \langle (\delta y_m)^2 \rangle = \sum_{m=1}^N \text{Var}(y_m) \quad (\text{E.2})$$

Die gemessenen Größen  $\vec{y}$  repräsentieren im Bezug auf die SIM die in den  $N$  Rohbildern gemessenen Intensitätswerte auf einem beliebigen Bildpunkt. Wie in Abschnitt 3.2 erläutert, lässt sich das gemessene Signal  $y_m$  im  $m$ -ten Rohbild auf einem beliebigen Bildpunkt  $\vec{x}_\perp$  folgendermaßen schreiben:

$$y_m = i_m(\vec{x}_\perp) = i^{(0)}(\vec{x}_\perp) + \sum_{n=1}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} m_n i^{(n)}(\vec{x}_\perp) \cos(\vec{k}^{(n)} \vec{x}_\perp - \alpha_m^{(n)}) \quad (\text{E.3})$$

$i^{(0)}$  bezeichnet das in der Messung enthaltene unmodulierte Signal, welches für alle Bildpunkte sowohl das Infokus- als auch Ausserfokussignal enthält.  $m_n$  ist die Modulation der  $n$ -ten in der Anregungsintensität enthaltenen Musterfrequenz und  $i^{(n)}$  ist der Anteil der gemessenen Intensität  $i_m$ , der mit der  $n$ -ten Musterfrequenz  $\vec{k}^{(n)}$  der Anregung moduliert ist. Die relative Phasenverschiebung der  $n$ -ten Frequenz im  $m$ -ten Rohbild wird wieder mit  $\alpha_m^{(n)}$  bezeichnet und die absoluten Phasen  $\Phi_0^{(n)}$  werden vernachlässigt.

Setzt man das gemessene Signal aus Gleichung (E.3) in Gleichung (E.2) ein, so erhält man

$$\begin{aligned} \langle |\delta \vec{y}|^2 \rangle &= \sum_{m=1}^N \left[ \text{Var}(i^{(0)}) + \sum_{n=1}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} m_n^2 \text{Var}(i^{(n)}) \cos^2(\vec{k}^{(n)} \vec{x} - \alpha_m^{(n)}) \right] = \\ &= N \text{Var}(i^{(0)}) + N \sum_{n=1}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} \frac{m_n^2}{2} \text{Var}(i^{(n)}) \quad . \end{aligned} \quad (\text{E.4})$$

Das Betragsquadrat  $|\delta \vec{x}|^2$  auf der linken Seite von Gleichung (E.1) ergibt im Mittel über mehrere Messungen die Summe der Varianzen der berechneten Größen  $x^{(n)}$ :

$$\langle |\delta \vec{x}|^2 \rangle = \sum_{n=-\lfloor \frac{N}{2} \rfloor}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} \langle |\delta x^{(n)}|^2 \rangle = \sum_{n=-\lfloor \frac{N}{2} \rfloor}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} \text{Var}(x^{(n)}) \quad (\text{E.5})$$

Ist die Matrix  $\hat{A}$  wie in den Abschnitten 3.2, 4.1 bzw. 4.2 definiert proportional zu einer unitären Matrix, so ist  $\|\hat{A}\|_2 = 1/\sqrt{N}$  (siehe Gleichung (E.1)). Außerdem kann man in diesem Fall annehmen, dass die Varianzen der Lösungen  $\text{Var}(x^{(n)})$  in Gleichung (E.5) für alle  $n$  im Mittel gleich groß sind, d.h.

$$\langle |\delta \vec{x}|^2 \rangle = N \cdot \text{Var}(x^{(n)}) \quad .$$

Zusammen mit Gleichung (E.1) folgt daraus für die Varianz der ausgewerteten SIM Signale  $I^{(n)}$  ( $n \neq 0$ ):

$$\begin{aligned}
 N \cdot \text{Var}(x^{(n)}) &= N \cdot \text{Var}\left(\frac{m_n}{2} I^{(n)}(\vec{x}_\perp) e^{i\vec{k}^{(n)} \cdot \vec{x}_\perp}\right) \leq \overbrace{\|\hat{A}^{-1}\|_2^2}^{\frac{1}{N^2}} N \left( \text{Var}(i^{(0)}(\vec{x}_\perp)) + \sum_{n=1}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} \frac{m_n^2}{2} \text{Var}(i^{(n)}(\vec{x}_\perp)) \right) \\
 \Rightarrow \text{Var}(I^{(n)}(\vec{x}_\perp)) &\leq \frac{4}{m_n^2 \cdot N} \left[ \text{Var}(i^{(0)}(\vec{x}_\perp)) + \sum_{n=1}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} \frac{m_n^2}{2} \text{Var}(i^{(n)}(\vec{x}_\perp)) \right] \quad (\text{E.6})
 \end{aligned}$$

Daraus folgt für den relativen Fehler des ausgewerteten SIM-Signals:

$$\begin{aligned}
 \frac{\sigma(I^{(n)})}{I^{(n)}} &\leq \frac{2}{m_n \cdot \sqrt{N} i^{(n)}} \sqrt{\text{Var}(i^{(0)}) + \sum_{n=1}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} \frac{m_n^2}{2} \text{Var}(i^{(n)})} \\
 \Rightarrow_{I^{(n)}=i^{(n)}} \sigma(I^{(n)}) &\leq \frac{2}{m_n \sqrt{N}} \sqrt{\text{Var}(i^{(0)}) + \sum_{n=1}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} \frac{m_n^2}{2} \text{Var}(i^{(n)})} \quad (\text{E.7})
 \end{aligned}$$

Falls die Mustermoduleationen  $m_n$  klein sind (d.h.  $m_n \ll 1$ ), so ergibt sich als Näherung für Gleichung (E.7)

$$\sigma(I^{(n)}) \approx \frac{2}{m_n \sqrt{N}} \sigma(i^{(0)}) .$$

Für das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ergibt sich dementsprechend in Analogie zu [Hag12]:

$$\text{SNR}(i^{(n)}) \approx \frac{m_n \sqrt{N}}{2} \frac{i^{(n)}}{\sigma(i^{(0)})} \quad (\text{E.8})$$

Aus Gleichungen (E.7) bzw. (E.8) folgt, dass der Fehler des ausgewerteten SIM Signals vom Fehler des in den Rohbildern enthaltenen Signals  $i^{(0)}$  abhängt, wobei sich  $i^{(0)}$  wie beschrieben als Summe von Ausserfokus- und Infokus-Signal interpretieren lässt. D.h. je mehr Ausserfokus-Signal in einem Rohbild enthalten ist, (bzw. je dicker die mikroskopische Probe ist) umso mehr Rauschen wird ein ausgewertetes SIM Bild enthalten. Je größer die Modulation des SIM-Musters in den gemessenen Rohbildern ist, umso kleiner wird der Fehler des ausgewerteten Signals.

Geht man bei dem Fehler von  $i^{(0)}$  von einer Poisson-Verteilung aus (d.h.  $\sigma(i^{(0)}) = \sqrt{\langle i^{(0)} \rangle}$ ) und nimmt an, dass die gemessenen Signale  $i^{(0)}$  und  $i^{(n)}$  proportional zur Belichtungszeit  $\tau$  in jedem Rohbild sind, so ergibt sich für das Signal-zu-Rausch-Verhältnis:

$$\boxed{\text{SNR}(i^{(n)}) \approx \frac{m_n \sqrt{T}}{2} \frac{i^{(n)}}{\sqrt{\langle i^{(0)} \rangle}}} ,$$

wobei  $N\tau = T$  die gesamte Belichtungszeit über  $N$  Rohbilder bezeichnet. Der Fehler des ausgewerteten Signals hängt also nur von der gesamten Belichtungszeit ab und ist unabhängig von der Anzahl der gemessenen Rohbilder, solange das insgesamt gemessene Signal  $i_m(\vec{x}_\perp)$  in jedem einzelnen Rohbild deutlich größer ist als der Dunkelstrom der Kamera. Die Auslese-dauer der Kamera, sowie die Zeit die benötigt wird um ein Rohbild zu speichern muss jeweils kleiner als  $\tau$  sein.

## E.1. Fehlerfortpflanzung mit Orientierungsfehler

Falls der Orientierungswinkel des Verschiebevektors  $\vec{\Delta}$  (siehe Abschnitte 4.1 bzw. 4.2) einen Fehler aufweist, wird dieser in die Auswertung mit eingehen. Es wird im Folgenden angenommen, dass der Orientierungswinkel  $\theta$  des Verschiebevektors  $\vec{\Delta}$  mit einem Fehler  $\delta\theta$  versehen ist. Die Beträge der Verschiebung  $|\vec{\Delta}|$  sollen fehlerlos sein, d.h. die Phasenverschiebung der Frequenz  $\vec{k}^{(1)}$  von einem zum nächsten Rohbild beträgt  $\alpha_2^{(1)} = \frac{2\pi}{N}$ .

Man kann hier zwei Fälle unterscheiden:

- Der Orientierungsfehler ist nicht bekannt und die Auswertung erfolgt wie im vorigen Abschnitt mit einer Matrix  $\hat{A}$ , die bis auf einen konstanten Faktor unitär ist. In dem Fall lässt sich der absolute Fehler von  $I^{(n)}$  mit Gleichung (E.6) abschätzen. Die berechneten Signale  $I^{(n)}$  werden dann aber nicht mehr mit den gemessenen Signalen  $i^{(n)}$  übereinstimmen. Da die Matrix  $\hat{A}$  proportional zu einer unitären Matrix ist, ist die Konditionszahl  $K$  gleich 1 und aufgrund der Matrixnorm von  $\hat{A}$  gilt  $|\vec{x}| = 1/\sqrt{N} \cdot |\vec{y}|$ , woraus mit Gleichung (A.3) als Abschätzung für den Fehler folgt:

$$\begin{aligned} \langle |\delta\vec{x}| \rangle &\leq \frac{1}{\sqrt{N}} \langle |\delta\vec{y}| \rangle \\ \text{Var}(I^{(n)}) &\leq \frac{4}{m_n^2 \cdot N} \left[ \text{Var}(i^{(0)}) + \sum_{n=1}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} \frac{m_n^2}{2} \text{Var}(i^{(n)}) \right] \end{aligned}$$

Aufgrund des Fehlers des Orientierungswinkels unterscheiden sich die tatsächlichen Phasenverschiebungen der Frequenzen  $\vec{k}^{(n)}$ ,  $|n| \in \{2, \dots, \lfloor \frac{N}{2} \rfloor\}$  von den für diese Frequenzen erwarteten Phasenverschiebungen. D.h. die Modulationen dieser Frequenzen werden in den ausgewerteten Signalen  $I^{(n)}$  noch als periodische Artefakte enthalten sein.

- Der Orientierungsfehler ist bekannt und wird in der Auswertung berücksichtigt. Aus

dem Winkel  $\theta$  wird entsprechend Gleichungen (4.11) bzw. (4.35) der Wert von  $\kappa$  ermittelt, welcher dann gemäß (4.25) bzw. (4.37) in die Matrix  $\hat{A}$  eingeht. In diesem Fall ist die Matrix  $\hat{A}$  nicht proportional zu einer unitären Matrix. Solange der Fehler von  $\theta$  bzw.  $\kappa$  klein genug bleibt, so dass  $\det(\hat{A}) \neq 0$ , lässt sich die Matrix invertieren und das Gleichungssystem ist lösbar. In diesem Fall führt die Inversion von  $\hat{A}$  zur richtigen Lösung des Gleichungssystems, d.h.  $I^{(n)} = i^{(n)} \quad \forall n \in \{0, \dots, \lfloor \frac{N}{2} \rfloor\}$ . Für die Vektoren aus unbekannten und gemessenen Größen heißt das:  $|\vec{x}| = 1/\sqrt{N}|\vec{y}|$ . Für die Fehler der ausgewerteten und gemessenen Größen gilt daher (entsprechend Gleichung (A.3)) die Abschätzung:

$$\frac{|\delta \vec{x}|}{|\vec{x}|} \leq K \frac{|\delta \vec{y}|}{|\vec{y}|} \Rightarrow |\delta \vec{x}| \leq \frac{K}{\sqrt{N}} |\delta \vec{y}|$$

Andererseits gilt aufgrund der Definition der Spektralnrm für Matrizen ebenso die folgende Abschätzung für den Fehlervektor:

$$|\delta \vec{x}| \leq \|\hat{A}^{-1}\|_2^2 \cdot |\delta \vec{y}| \quad (\text{E.9})$$

Aus der Definition der Konditionszahl (siehe Gleichung (A.4)) und der Matrix  $\hat{A}$  folgt:

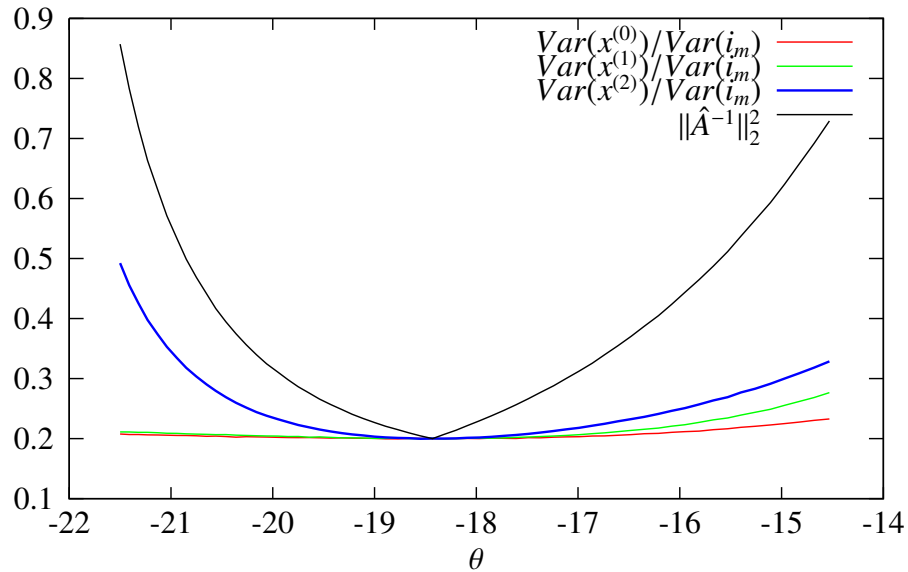
$$\frac{K}{\sqrt{N}} = \|\hat{A}^{-1}\|_2 \cdot \underbrace{\|\hat{A}\|_2}_{\geq 1} \cdot \frac{1}{\sqrt{N}} \Rightarrow \frac{K}{\sqrt{N}} \geq \|\hat{A}^{-1}\|_2$$

D.h. dass die Matrixnorm der inversen von  $\hat{A}$  in Gleichung (E.9) als obere Schranke für die Varianz das präzisere Kriterium ist. Im Mittel über mehrere Messungen ergibt sich daher entsprechend Gleichungen (E.4) und (E.5)

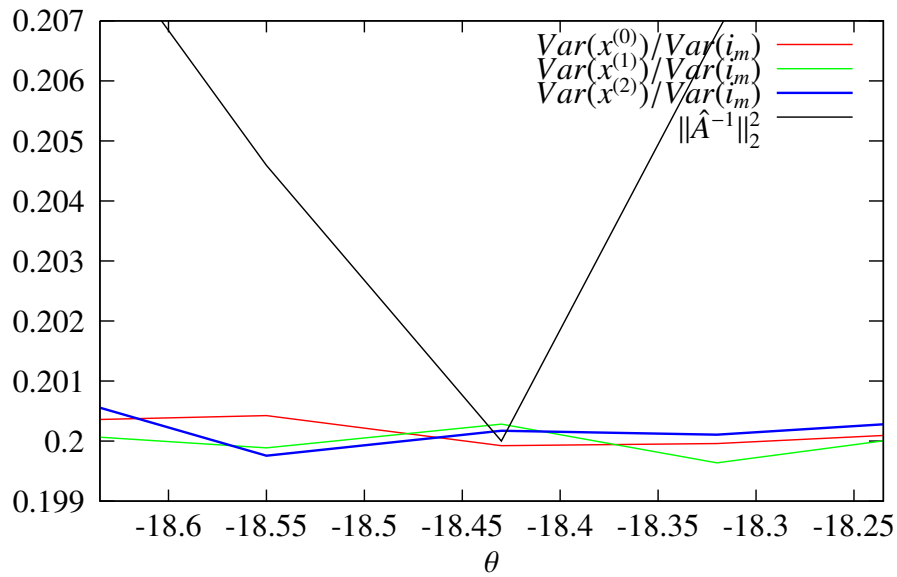
$$\begin{aligned} \sum_{n=-\lfloor \frac{N}{2} \rfloor}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} \text{Var}(x^{(n)}) &\leq \|\hat{A}^{-1}\|_2^2 \text{Var}(i_m) \\ \Rightarrow \sum_{n=-\lfloor \frac{N}{2} \rfloor}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} \text{Var}(I^{(n)}) &\leq \frac{4}{m_n^2} \|\hat{A}^{-1}\|_2^2 \text{Var}(i_m) \end{aligned} \quad (\text{E.10})$$

Die Varianz im Rohbild  $i_m$  ist für alle Rohbilder gleich, solange alle Rohbilder mit derselben Belichtungszeit aufgenommen wurden, was üblicherweise der Fall ist. Im Gegensatz dazu, kann in dem hier beschriebenen Fall nicht mehr davon ausgegangen werden, dass die Varianzen der berechneten Größen  $x^{(n)}$  für alle  $n$  gleich groß sind (siehe Abbildung E.1). Die Spektralnrm der Matrix  $\hat{A}$  stellt nur eine obere Schranke für die Varianz der berechneten Größen abhängig vom Fehler der Meßdaten dar.

Der Winkelfehler  $\delta\theta$  der Orientierung der Musterfrequenzen relativ zur Verschieberichtung des Musterbildes in der Probe ist im Experiment typischerweise kleiner als  $0,1^\circ$ . An dem Beispiel in Abbildung E.1 sieht man, dass Winkelfehler dieser Größenordnung vernachlässigbar sind, da sie die Varianz der ausgewerteten Größen kaum beeinflussen.



(a) Für große Winkelfehler wird die Varianz der berechneten Größen  $I^{(n)}$  beliebig groß, da für  $\det(\hat{A}) = 0$  keine analytische Lösung existiert. Die Varianzen der einzelnen berechneten Größen stimmen bei großen Winkelfehlern nicht mehr überein.



(b) Kleine Winkelfehler ( $|\delta\theta| < 0,2^\circ$ ) können vernachlässigt werden, da sie den Fehler der ausgewerteten Größen nur marginal beeinflussen.

**Abb. E.1.:** Die Varianzen der ausgewerteten Größen  $I^{(n)}$  normiert auf die Varianz der gemessenen Größen  $i_m$  im Fall der Schachbrett-SIM (mit  $N = 5$ ) als Funktion des Orientierungswinkels des Verschiebevektors  $\vec{\Delta}$ . Für den Winkel  $\theta \approx -18,4356^\circ$  (siehe Abschnitt 4.1) ist  $\hat{A}$  eine unitäre Matrix und die Varianz der ausgewerteten Größen beträgt  $1/5$  der Varianz der Eingangsgrößen.





## F. Fehlerfortpflanzung bei Superresolution SIM

In diesem Abschnitt wird die Fehlerfortpflanzung für SR-SIM mit linien- und hexagonalen Mustern erläutert. Wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, wird ein (3D) Superresolution SIM Bild(-stapel) im Allgemeinen im Frequenzraum durch Überlagerung der entsprechenden Frequenzbänder berechnet. Wie in Gleichung (3.17) bzw. (3.18) sind die Vektoren aus unbekannten ( $x^n$ ) und gemessenen Größen ( $y_m$ ) gegeben durch:

$$x^{(n)} = \begin{cases} \tilde{D}^{(0)}(\vec{k}) & \text{falls } n = 0 \\ \frac{m_n}{2} \tilde{D}^{(n)}(\vec{k}) & \text{falls } n \neq 0 \end{cases}$$

$$y_m = \tilde{i}_m(\vec{k}) = \tilde{d}^{(0)}(\vec{k}) + \sum_{n \neq 0} \frac{m_n}{2} e^{-i\alpha_m^{(n)}} \tilde{d}^{(n)}(\vec{k})$$

Im Fall von 2D-Superresolution SIM (d.h. es wird kein Bildstapel sondern Rohbilder in einer Bildebene bzw.  $z$ -Position gemessen) entspricht  $\tilde{d}^{(0)}(\vec{k})$  für jede Frequenz  $\vec{k}$  dem Epifluoreszenzsignal und enthält daher sowohl Ausser- als auch Infokussignal. Genau genommen ist  $\tilde{d}^{(0)}$  gegeben durch die Fouriertransformation der Größe  $i^{(0)}(\vec{x}_\perp)$  in Gleichung (E.3).

### F.1. Varianz der Frequenzbänder

Wie in Abschnitt 3.3 bzw. 3.3.3 sind die Frequenzbänder  $\tilde{D}^{(n)}(\vec{k})$  gegeben durch

$$\tilde{D}^{(n)}(\vec{k}) = O_n(\vec{k}) \tilde{S}(\vec{k} - \vec{k}^{(n)}) ,$$

wobei  $O_n(\vec{k})$  die OTF des Mikroskopobjektivs ist. Der Index  $n$  der OTF ist nur notwendig im Fall von 3D SR-SIM, d.h. wenn Rohbilder für mehrere verschiedene  $z$ -Positionen zu einem

Bildstapel ausgewertet werden. Im Fall von  $n \in \{1, 2, 3\}$ , d.h. für die Grundfrequenz des Hexagons ist  $O_n(\vec{k})$  gegeben durch die Fouriertransformierte der in Gleichung (3.30) definierten Emissions-PSF  $h_n^{\text{em}}(\vec{x})$ . Analog zu Gleichung (E.6) in Abschnitt E.1 ergibt sich auch hier:

$$\begin{aligned}
 \sum_{n=-\lfloor \frac{N}{2} \rfloor}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} \text{Var}[x^{(n)}(\vec{k})] &\leq \|\hat{A}\|_2^2 \sum_{m=1}^N \text{Var}[y_m(\vec{k})] = \|\hat{A}\|_2^2 \sum_{m=1}^N \text{Var}[\tilde{i}_m(\vec{k})] \\
 N \cdot \text{Var}(x^{(n)})(\vec{k}) &\leq \|\hat{A}^{-1}\|_2^2 \cdot N \cdot \left\{ \text{Var}[\tilde{d}^{(0)}(\vec{k})] + \sum_{\substack{n=-\lfloor \frac{N}{2} \rfloor \\ n \neq 0}}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} \frac{m_n^2}{4} \text{Var}[\tilde{d}^{(n)}(\vec{k} - \vec{k}^{(n)})] \right\} \\
 \Rightarrow \text{Var}[x^{(n)}(\vec{k})] &\leq \|\hat{A}^{-1}\|_2^2 \cdot \left\{ \text{Var}[\tilde{d}^{(0)}(\vec{k})] + \sum_{n=1}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} \frac{m_n^2}{2} \text{Var}[\tilde{d}^{(n)}(\vec{k} - \vec{k}^{(n)})] \right\} \quad (\text{F.1})
 \end{aligned}$$

Analog zu Abschnitt E.1 werden die gemessenen Frequenzbänder mit  $\tilde{d}^{(n)}(\vec{k})$ , die berechneten Frequenzbänder mit  $\tilde{D}^{(n)}(\vec{k})$  bezeichnet.

Die Varianz des gemessenen Signals im Ortsraum ist im Falle eines Poisson-verteilten Rauschens durch das auf einem Bildpunkt gemessenen Signal gegeben, d.h. die Varianz ist im Allgemeinen eine Funktion der räumlichen Koordinate  $\vec{x}_\perp$  (bzw. in 3D  $\vec{x}$ ). Im Gegensatz dazu, ist die Varianz der Frequenzbänder im Frequenzraum unabhängig von der Amplitude des Bandes und damit unabhängig von der Koordinate  $\vec{k}$  im Frequenzraum. Daher lässt sich die Varianz eines Frequenzbandes  $\text{Var}[\tilde{d}^{(n)}(\vec{k})]$  durch die mittlere Varianz im Frequenzraum abschätzen:

$$\text{Var}[\tilde{d}^{(n)}(\vec{k})] \approx \overline{\text{Var}[\tilde{d}^{(n)}(\vec{k})]} = \left\langle \text{Var}[\tilde{d}^{(n)}(\vec{k})] \right\rangle_{\vec{k}} =: \overline{\sigma(\tilde{d}^{(n)})^2}$$

$\langle \cdot \rangle_{\vec{k}}$  bezeichnet hierbei das Mittel über den Frequenzraum. Für den Ausdruck innerhalb der geschweiften Klammern auf der rechten Seite von Gleichung (F.1) ergibt sich durch diese Definition

$$\left\langle \sum_{m=1}^N \text{Var}[\tilde{i}_m(\vec{k})] \right\rangle_{\vec{k}} = N \overline{\sigma(\tilde{d}^{(n)})^2} \left( 1 + \sum_{n=1}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} \frac{m_n^2}{2} \right). \quad (\text{F.2})$$

Aus dem Parsevalschen Theorem folgt, dass das Integral über die Varianzen im Ortsraum bis auf einen konstanten Faktor das gleiche Ergebnis liefert, wie das Integral über die Varianzen im Frequenzraum:

$$\frac{1}{(2\pi)^D} \int d^D x \text{Var}[i_m(\vec{x})] = \int d^D k \text{Var}[\tilde{i}(\vec{k})] \Rightarrow \frac{1}{(2\pi)^D} \langle \text{Var}[i_m(\vec{x})] \rangle_{\vec{x}} = \langle \text{Var}[\tilde{i}_m(\vec{k})] \rangle_{\vec{k}}$$

Die Variable  $\mathcal{D}$  bezeichnet die Dimension des Orts- bzw. Frequenzraums, d.h. entweder gilt  $\mathcal{D} = 2$  oder  $\mathcal{D} = 3$ . Daraus folgt für die Varianz im  $m$ -ten Rohbild in Gleichung (F.2):

$$\left\langle \sum_{m=1}^N \text{Var}[\tilde{i}_m(\vec{k})] \right\rangle_{\vec{k}} = N \overline{\sigma(\tilde{d}^{(n)})^2} \left( 1 + \sum_{n=1}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} \frac{m_n^2}{2} \right) = \frac{1}{(2\pi)^{\mathcal{D}}} \left\langle \sum_{m=1}^N \text{Var}[i_m(\vec{x})] \right\rangle_{\vec{x}}$$

Eingesetzt in Gleichung (F.1) ergibt sich daraus

$$\text{Var}[\tilde{D}^{(n)}(\vec{k})] \leq \begin{cases} \|\hat{A}^{-1}\|_2^2 \overline{\sigma(\tilde{d}^{(n)})^2} \left( 1 + \sum_{n=1}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} \frac{m_n^2}{2} \right) = \|\hat{A}^{-1}\|_2^2 \frac{1}{N(2\pi)^{\mathcal{D}}} \left\langle \sum_{m=1}^N \text{Var}[i_m(\vec{x})] \right\rangle_{\vec{x}} & \text{falls } n = 0 \\ \frac{4}{m_n^2} \|\hat{A}^{-1}\|_2^2 \overline{\sigma(\tilde{d}^{(n)})^2} \left( 1 + \sum_{n=1}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} \frac{m_n^2}{2} \right) = \frac{4}{m_n^2} \|\hat{A}^{-1}\|_2^2 \frac{1}{N(2\pi)^{\mathcal{D}}} \left\langle \sum_{m=1}^N \text{Var}[i_m(\vec{x})] \right\rangle_{\vec{x}} & \text{falls } n \neq 0 \end{cases} \quad (\text{F.3})$$

Falls das Rauschen Poisson-verteilt ist, ist die mittlere Varianz im  $m$ -ten Rohbild  $\langle \text{Var}[i_m(\vec{x})] \rangle_{\vec{x}}$  in Gleichung (F.3) gegeben durch die mittlere Intensität im Rohbild  $\langle i_m(\vec{x}) \rangle_{\vec{x}}$ . D.h. der Ausdruck  $\left\langle \sum_{m=1}^N \text{Var}[i_m(\vec{x})] \right\rangle_{\vec{x}}$  in Gleichung (F.3) ist in diesem Fall gegeben durch

$$\left\langle \sum_{m=1}^N \text{Var}[i_m(\vec{x})] \right\rangle_{\vec{x}} = \left\langle \sum_{m=1}^N i_m(\vec{x}) \right\rangle_{\vec{x}} = N \cdot \langle i^{(0)}(\vec{x}) \rangle_{\vec{x}} = N \cdot \langle \text{Var}[i^{(0)}(\vec{x})] \rangle_{\vec{x}} .$$

Die Varianz eines berechneten Frequenzbandes hängt in diesem Fall somit von der Modulation der entsprechenden Frequenzordnung in der Probe  $m_n$ , der Matrixnorm der Matrix  $\hat{A}$  und der mittleren Intensität des unmodulierten Signals  $\overline{i^{(0)}(\vec{x})}$  ab, welches sowohl Ausser- als auch Infokus Intensitäten enthält. Das mittlere Signal  $\overline{i^{(0)}(\vec{x})}$  ist proportional zum gesamten gemessenen nicht-konfokalen Signal.

Für den Fall, dass nur eine einzelne  $z$ -Ebene mikroskopiert wird, heißt das in Analogie zu den Ergebnissen in Abschnitt E, dass das Rauschen im ausgewerteten Bild vom gesamten gemessenen nicht-konfokalen Signal  $i^{(0)}(\vec{x}_{\perp})$  bzw.  $\tilde{d}^{(0)}(\vec{k}_{\perp})$  abhängt bzw. dass das Rauschen des Ausserfokus-Signals mit in die Auswertung des quasikonfokalen Signals mit eingeht.

Falls Rohbilder in mehreren  $z$ -Positionen aufgenommen werden, wird das gesamte Ausserfokus-Signal in jeder einzelnen Ebene erneut gemessen. In jedem Fall nimmt die Varianz der ausgewerteten Frequenzbänder mit wachsendem Ausserfokus-Signal bzw. mit wachsender Proben-  
dicke zu.

## F.2. Varianz und SNR des rekonstruierten Objekts

Die Berechnung des rekonstruierten Objekts erfolgt durch Überlagerung der berechneten Frequenzbänder  $\tilde{D}^{(n)}(\vec{k})$ . Im Folgenden wird die optimale Überlagerung der Frequenzbänder gemäß Gleichung (3.23) betrachtet:

$$\tilde{S}(\vec{k}) = \frac{\sum_{n=-\lfloor \frac{N}{2} \rfloor}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} O^*(\vec{k} + \vec{k}^{(n)}) \tilde{D}^{(n)}(\vec{k} + \vec{k}^{(n)})}{\sum_{n=-\lfloor \frac{N}{2} \rfloor}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} |O(\vec{k} + \vec{k}^{(n)})|^2 + \epsilon^2}$$

Daraus folgt für die Varianz des rekonstruierten Objekts  $\tilde{S}(\vec{k})$ :

$$\begin{aligned} \text{Var}[\tilde{S}(\vec{k})] &= \frac{1}{\left| \sum_{n=-\lfloor \frac{N}{2} \rfloor}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} |O_n(\vec{k} + \vec{k}^{(n)})|^2 + \epsilon^2 \right|^2} \cdot \sum_{n=-\lfloor \frac{N}{2} \rfloor}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} |O_n(\vec{k} + \vec{k}^{(n)})|^2 \cdot \text{Var}[\tilde{D}^{(n)}(\vec{k} + \vec{k}^{(n)})] \\ &\stackrel{(F.3)}{=} \|\hat{A}\|_2^2 \frac{\frac{1}{(2\pi)^D} \langle \text{Var}[i^{(0)}(\vec{x})] \rangle_{\vec{x}}}{\left| \sum_{n=-\lfloor \frac{N}{2} \rfloor}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} |O_n(\vec{k} + \vec{k}^{(n)})|^2 + \epsilon^2 \right|^2} \left( |O_0(\vec{k})|^2 + 2 \sum_{n=1}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} \frac{4}{m_n^2} |O_n(\vec{k} + \vec{k}^{(n)})|^2 \right) \quad (F.4) \end{aligned}$$

Aus den Gleichungen (3.23) und (F.4) folgt das Signal-zu-Rausch-Verhältnis für das rekonstruierte Objekt als Funktion der Raumfrequenz  $\vec{k}$ :

$$SNR[\tilde{S}(\vec{k})] = \frac{(2\pi)^{\frac{D}{2}}}{\|\hat{A}\|_2} \frac{\sum_{n=-\lfloor \frac{N}{2} \rfloor}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} O^*(\vec{k} + \vec{k}^{(n)}) \tilde{D}^{(n)}(\vec{k} + \vec{k}^{(n)})}{\sqrt{\langle \text{Var}[i^{(0)}(\vec{x})] \rangle_{\vec{x}}} \sqrt{1 + 2 \sum_{n=1}^{\lfloor \frac{N}{2} \rfloor} \frac{4}{m_n^2} |O_n(\vec{k} + \vec{k}^{(n)})|^2}}$$

## G. Die optimale Überlagerung der Frequenzbänder bei der SR-SIM

Wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben, ist die lineare Überlagerung der Frequenzbänder  $\tilde{D}_m^d(\vec{k} + m\vec{k}_g^d)$  keine optimale Lösung für die Rekonstruktion des unbekannten Objektspektrums  $\tilde{S}(\vec{k})$ . Für die optimale Überlagerung sind zunächst Filterfunktionen  $F_m^d(\vec{k})$  gesucht, so dass

$$\tilde{S}^{(\text{opt})}(\vec{k}) = \sum_{d=1}^3 \sum_{m=-1}^1 F_m^d(\vec{k}) \tilde{D}_m^d(\vec{k} + m\vec{k}_g^d)$$

eine möglichst genaue Rekonstruktion des Objektspektrums  $\tilde{S}$  ergibt [Rig13]. Die optimalen Filterfunktionen können durch die Minimierung des Funktionals

$$\mathcal{L}^{(\text{opt})} = \int \left[ \sum_{d,m} |O(\vec{k} + m\vec{k}_g^d) \tilde{S}^{(\text{opt})}(\vec{k}) - \tilde{D}_m^d(\vec{k} + m\vec{k}_g^d)|^2 + \epsilon |A(\vec{k}) \tilde{S}^{(\text{opt})}(\vec{k})|^2 \right] d^2k \quad (\text{G.1})$$

hergeleitet werden. Hierbei ist diejenige Objektfunktion  $\tilde{S}^{(\text{opt})}(\vec{k})$  gesucht, welche in Gleichung (G.1) den minimalen Wert ergibt. Das erste Betragsquadrat entspricht einem Fehlerterm. Das zweite Betragsquadrat ist ein Regularisierungsterm. Der Parameter  $\epsilon \in \mathbb{R}$  ist der Regularisierungsparameter. Die Funktion  $A(\vec{k})$  ist die Gewichtsfunktion der Regularisierung und definiert als

$$A(\vec{k}) := |\vec{k}|^p, \quad ,$$

wobei  $p \in \mathbb{Z}$ . Für  $p = 1$  wird der Gradient der Gesamtenergie des Signals regularisiert, für  $p = 2$  wird die zweite Ableitung der Gesamtenergie regularisiert. In [Gus00a] wird  $p = 0$  gewählt, was einer Regularisierung der Gesamtenergie des Signals entspricht. Die Minimierung des Funktionals in Gleichung (G.1) ergibt

$$F_m^d(\vec{k}) = \frac{O^*(\vec{k} + m\vec{k}_g^d)}{\epsilon^2 A(\vec{k})^2 + \sum_{d=1}^3 \sum_{m=-1}^1 |O(\vec{k} + m\vec{k}_g^d)|^2} .$$

Für die gesuchte optimale Rekonstruktion  $\tilde{S}^{(\text{opt})}(\vec{k})$  führt das zu:

$$\tilde{S}^{(\text{opt})}(\vec{k}) = \frac{\sum_{d=1}^3 \sum_{m=-1}^1 O^*(\vec{k} + m\vec{k}_g^d) \tilde{D}_m^d(\vec{k} + m\vec{k}_g^d)}{\epsilon^2 A(\vec{k})^2 + \sum_{d=1}^3 \sum_{m=-1}^1 |O(\vec{k} + m\vec{k}_g^d)|^2} \quad (\text{G.2})$$

Die Lösung für  $\tilde{S}^{(\text{opt})}(\vec{k})$  in Gleichung (G.2) stimmt für die Wahl  $p = 0$  bzw.  $A(\vec{k}) \equiv 1$  mit der Lösung in Gleichung (3.23) in Abschnitt 3.3.2 überein und führt wie in selbigem Abschnitt beschrieben zu negativen Intensitätswerten in der Rekonstruktion.

Für den Fall, dass mehr als drei ( $m \in \{-1, 0, 1\}$ ) Frequenzbänder in einer Orientierung  $d$  des SIM-Musters existieren, werden die Summen entsprechend über alle vorhandenen Bänder ausgeführt.

## H. Schachbrett-SIM mit mehr als fünf Unbekannten

In bestimmten Situationen wird das Musterbild in der Probe – anders als in Abschnitt 4.1 – mehr als zwei modulierte Frequenzordnungen enthalten. Das ist z.B. der Fall, wenn bei inkohärenter Beleuchtung des Mustersubstrats ein Muster mit großer Periode verwendet wird, oder aber das Muster kohärent beleuchtet wird. Auch im Fall nichtlinearer Anregung der Probe werden in der detektierten Intensität mehr als nur zwei modulierte Frequenzordnungen enthalten sein. Das führt analog zu Gleichung (4.10) für mehrere Phasenbilder zu einem linearen Gleichungssystem mit mehr als 5 Unbekannten.

Vorerst wird von dem rein periodischen Anteil des Schachbrettmusters  $\mathfrak{S}_p$  aus Gleichung (4.7) ausgegangen, d.h. die im Muster enthaltenen Frequenzordnungen sind gegeben durch:

$$\vec{k}_{m,n} = \frac{\pi}{a} \begin{pmatrix} m \\ n \end{pmatrix} \quad \left| \quad (m+n) \text{ gerade} \right. \quad (\text{H.1})$$

Die Frequenzvektoren  $\vec{k}_{m,n}$  in Gleichung (H.1) können als Linearkombination von  $\vec{k}^{(1)} := \vec{k}_{1,1}$  und  $\vec{k}^{(2)} := \vec{k}_{1,-1}$  geschrieben werden:

$$\begin{aligned} \vec{k}_{m,n} &= p\vec{k}^{(1)} + q\vec{k}^{(2)} \\ \Rightarrow \frac{\pi}{a} \begin{pmatrix} m \\ n \end{pmatrix} &= p\frac{\pi}{a} \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \end{pmatrix} + q\frac{\pi}{a} \begin{pmatrix} 1 \\ -1 \end{pmatrix} \\ \left. \begin{matrix} m = p + q \\ n = p - q \end{matrix} \right\} &\Rightarrow \begin{matrix} p = \frac{1}{2}(m+n) \in \mathbb{Z} \\ q = \frac{1}{2}(m-n) \in \mathbb{Z} \end{matrix} \\ \Rightarrow \vec{k}_{m,n} &= \frac{1}{2}(m+n)\vec{k}^{(1)} + \frac{1}{2}(m-n)\vec{k}^{(2)} \end{aligned}$$

Für die Phasenverschiebung der Frequenz  $\vec{k}_{m,n}$  im zweiten Rohbild  $\alpha_2^{(m,n)}$  folgt daraus

$$\alpha_2^{(m,n)} = \vec{k}_{m,n} \cdot \vec{\Delta} = \frac{m+n}{2} \alpha_2^{(1)} + \frac{m-n}{2} \underbrace{\alpha_2^{(2)}}_{\kappa \alpha_2^{(1)}} = (p + q\kappa) \alpha_2^{(1)}$$

Die Phasenverschiebungen aller Frequenzen des Schachbrettmusters aus Gleichung (H.1) sind, falls  $\kappa \in \mathbb{Z}$  ganzzahlige Vielfache der relativen Phasenverschiebung  $\alpha_2^{(1)}$  der Musterfrequenz  $\vec{k}^{(1)}$  vom ersten zum zweiten Rohbild. Diese wird üblicherweise den Wert  $\alpha_2^{(1)} = \frac{2\pi}{N}$  haben.

Im Fall von  $N = 9$ ,  $N = 13$  und  $N = 25$  in der Intensität enthaltenen Modulationsordnungen kann man beim Schachbrettmuster jeweils einen Winkel  $\theta$  für den Verschiebevektor finden, für den eine optimal konditionierte Lösung der unbekannten Größen existiert. Im Folgenden werden die entsprechenden Winkel hergeleitet.

### N=9

Die in Abschnitt 4.1 betrachteten Frequenzvektoren  $\vec{k}^{(1)} =: \vec{k}_{1,1}$  und  $\vec{k}^{(2)} =: \vec{k}_{1,-1}$  haben den Betrag  $\frac{\sqrt{2}\pi}{a}$ . Die nächst größere Frequenz nach Gleichung (H.1) hat einen Betrag von  $\frac{2\pi}{a}$ . Die zugehörigen Frequenzvektoren sind

$$\vec{k}^{(3)} := \vec{k}_{0,2} = \frac{\pi}{a} \begin{pmatrix} 0 \\ 2 \end{pmatrix} = \vec{k}^{(1)} + \vec{k}^{(2)} \quad (\text{H.2})$$

$$\vec{k}^{(4)} := \vec{k}_{2,0} = \frac{\pi}{a} \begin{pmatrix} 2 \\ 0 \end{pmatrix} = \vec{k}^{(1)} - \vec{k}^{(2)} \quad (\text{H.3})$$

Da es für jeden enthaltenen Frequenzvektor zwei Unbekannte gibt (für jede Frequenz  $n$  ein Modulations-Signal  $I^{(n)}$  und eine Phase  $\Phi_0^{(n)}$ ), sind in diesem Fall insgesamt  $N = 2 \cdot 4 + 1 = 9$  Phasenbilder notwendig. Wie in Abschnitt 4.1 wird für  $\vec{k}^{(1)}$  und  $\vec{k}^{(2)}$  ein Parameter  $\kappa$  eingeführt:

$$\left. \begin{aligned} \vec{k}^{(1)} \vec{\Delta} &= \alpha_2^{(1)} \\ \vec{k}^{(2)} \vec{\Delta} &= \alpha_2^{(2)} := \kappa \alpha_2^{(1)} \end{aligned} \right\} \Rightarrow \begin{aligned} \vec{k}^{(3)} \vec{\Delta} &= \alpha_2^{(3)} = (1 + \kappa) \alpha_2^{(1)} \\ \vec{k}^{(4)} \vec{\Delta} &= \alpha_2^{(4)} = (1 - \kappa) \alpha_2^{(1)} \end{aligned}$$

Wenn man wie in Abschnitt 4.1 annimmt, dass zwischen zwei aufeinanderfolgenden Phasenbildern immer dieselbe Verschiebung  $\vec{\Delta}$  des Musters erfolgt, so gilt

$$\alpha_m^{(n)} = (m-1) \alpha_2^{(n)} \quad \forall n \in \left\{ -\left\lfloor \frac{N}{2} \right\rfloor, \dots, \left\lfloor \frac{N}{2} \right\rfloor \right\}$$

Analog zu dem Vorgehen in Abschnitt 4.1 kann man auch hier wieder zwei mögliche Werte für  $\kappa$  finden, die eine optimal konditionierte Lösung des Gleichungssystems ermöglichen.



Für den Fall  $N = 9$  sind das  $\kappa_1 = 3$  und  $\kappa_2 = 6$ . Die entsprechenden Orientierungswinkel lassen sich durch Gleichung (4.11) bestimmen und sind näherungsweise  $\theta_1 \approx -26.565^\circ$  und  $\theta_2 \approx -35.538^\circ$ .

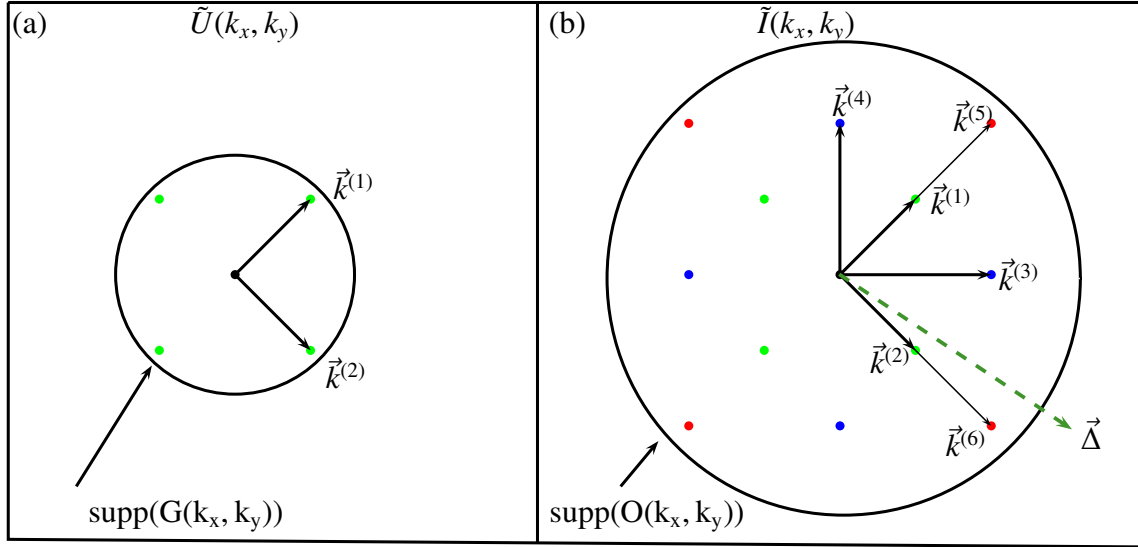
### N=13

Der nächst größere Frequenzbetrag im Raumfrequenzspektrum des Schachbretts ist  $\sqrt{2}\frac{2\pi}{a}$ . Berücksichtigt man auch Modulationen mit diesen Frequenzbeträgen in der detektierten Intensität, so ergeben sich insgesamt  $N = 13$  Unbekannte. Die Phasenverschiebungen dieser Frequenzen können wieder mit dem Parameter  $\kappa$  geschrieben werden:

$$\left. \begin{aligned} \vec{k}^{(5)} &:= \vec{k}_{2,2} = \frac{\pi}{a} \begin{pmatrix} 2 \\ 2 \end{pmatrix} = 2\vec{k}^{(1)} \\ \vec{k}^{(6)} &:= \vec{k}_{2,-2} = \frac{\pi}{a} \begin{pmatrix} 2 \\ -2 \end{pmatrix} = 2\vec{k}^{(2)} \end{aligned} \right\} \Rightarrow \begin{aligned} \vec{k}^{(5)} \vec{\Delta} &= \delta\Phi_5 := 2\alpha_2^{(1)} \\ \vec{k}^{(6)} \vec{\Delta} &= \delta\Phi_6 := 2\kappa\alpha_2^{(1)} \end{aligned}$$

Analog zu dem in Abschnitt 4.1 beschriebenen Vorgehen, lassen sich auch hier zwei Winkel  $\theta$  bzw. zwei Werte für  $\kappa$  finden, welche eine optimal konditionierte Auswertung ermöglichen. Diese sind  $\kappa_1 = 5$  und  $\kappa_2 = 8$ . Die entsprechenden Winkel sind  $\theta_1 \approx -33.690^\circ$  und  $\theta_2 \approx -37.875^\circ$ .

Der Winkel  $\theta_1 \approx -33.690^\circ$  für  $N = 13$  ist gerade bei kohärenter quasikonfokaler SIM interessant: Entspricht die Frequenz des Musters gerade  $\nu_p = 1$  (bzw.  $p = \lambda/\text{NA}$ ), so erhält man wie in Abschnitt 3.2 erläutert die best mögliche Konfokalität. Im Falle kohärenter Beleuchtung ist die erreichbare Konfokalität der SIM besser als bei inkohärenter Beleuchtung, da der Musterkontrast wie in Abschnitt 2.4.5 erläutert bei kohärenter Beleuchtung deutlich schneller mit dem Defokus abfällt. Für eine normalisierte Musterfrequenz von  $\nu = 1$  passieren die ersten Beugungsordnungen des Musters wie in Abbildung H.1 gezeigt die Pupille am Rand. Aus der Interferenz der fünf Beugungsordnungen (links in Abbildung H.1) entstehen im Intensitätsprofil insgesamt  $N = 13$  Frequenzordnungen.



**Abb. H.1.:** Skizze zur kohärenten Bildentstehung eines Schachbrettmusters. (a): Bei einer normalisierten Musterfrequenz des Schachbretts von  $\nu_g = 1$  können insgesamt fünf Beugungsordnungen die Objektivpupille  $G(k_x, k_y) = G(\frac{2\pi m}{\lambda f}(\xi, \eta))$  passieren. (b): Die Interferenz dieser fünf Beugungsordnungen führt zur insgesamt 13 Frequenzen im Raumfrequenzspektrum der Intensität  $\tilde{I}(k_x, k_y)$ . Die Orientierung des Verschiebevektors  $\vec{\Delta}$  relativ zu den Frequenzordnungen ist grün eingezeichnet.

### N=25

Berücksichtigt man auch die Frequenzen aus Gleichung (H.1) mit dem nächst größeren Betrag von  $\sqrt{10}\frac{\pi}{a}$ ,

$$\vec{k}^{(7)} = \frac{\pi}{a} \begin{pmatrix} 3 \\ 1 \end{pmatrix} \quad \vec{k}^{(8)} = \frac{\pi}{a} \begin{pmatrix} 3 \\ -1 \end{pmatrix} \quad \vec{k}^{(9)} = \frac{\pi}{a} \begin{pmatrix} 1 \\ 3 \end{pmatrix} \quad \vec{k}^{(10)} = \frac{\pi}{a} \begin{pmatrix} 1 \\ -3 \end{pmatrix}$$

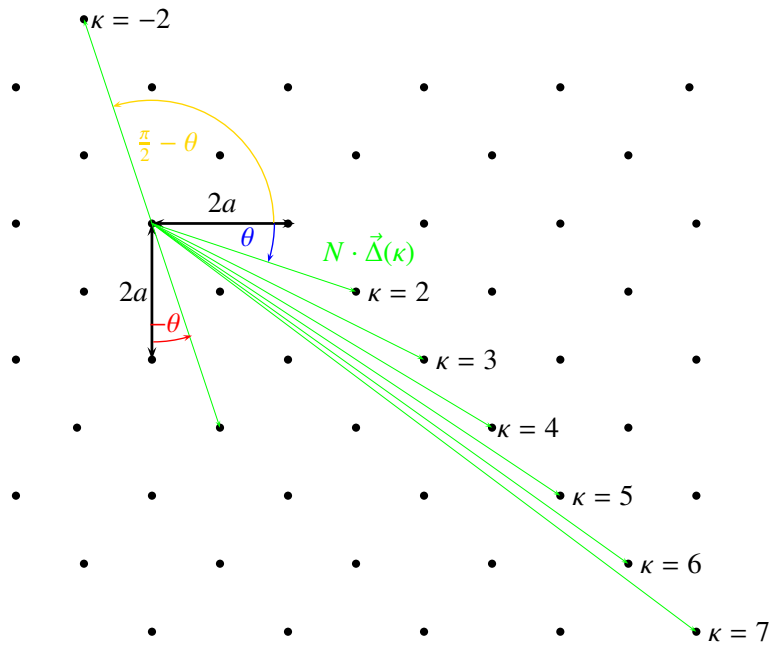
führt das zu insgesamt  $N = 21$  Unbekannten. Für diesen Fall existiert kein Winkel, der auf eine optimal konditionierte Lösung führt. Die nächst größeren Frequenzen mit dem Betrag  $4\frac{\pi}{a}$

$$\vec{k}^{(11)} = \frac{\pi}{a} \begin{pmatrix} 4 \\ 0 \end{pmatrix} \quad \vec{k}^{(12)} = \frac{\pi}{a} \begin{pmatrix} 0 \\ 4 \end{pmatrix}$$

führen zu  $N = 25$  Unbekannten. In diesem Fall kann man insgesamt vier verschiedene Verschieberichtungen  $\theta$  (bzw. vier verschiedene  $\kappa$ ) finden, für die eine optimal konditionierte Lösung der Frequenzordnungen existiert:

$$\kappa_1 = 5 \quad \kappa_2 = 20 \quad \kappa_3 = 10 \quad \kappa_4 = 15$$

Die Konstruktion unitärer Matrizen analog zu dem in Abschnitt 4.1 beschriebenen Vorgehen, wurde für die Frequenzen in Gleichung (H.1) in der Software *Matlab* der Firma *Mathworks*



**Abb. H.2.:** Der Verschiebevektor  $N \cdot \vec{\Delta}$  beim Schachbrettmuster als Funktion des Parameters  $\kappa$ .

implementiert. Für den Wertebereich  $25 < N < 1000$  existieren keine weiteren unitären Lösungen. Für jede Zahl  $N$  von unbekannten Größen, für die ein  $\kappa_1$  (bzw.  $\theta_1$ ) mit einer unitären Auswertung existiert, existiert auch  $\kappa_2$  (bzw.  $\theta_2$ ). Geometrisch entspricht der Übergang von  $\kappa_1$  zu  $\kappa_2$  der Spiegelung an  $\vec{k}^{(1)}$ :

$$\begin{aligned}\vec{k}^{(2)} &\rightarrow -\vec{k}^{(2)} \\ \kappa &\rightarrow -\kappa \\ \Rightarrow \kappa_2 &= N - \kappa_1\end{aligned}$$

Für  $N = 25$  gilt zusätzlich  $\kappa_4 = N - \kappa_3$ .

Die Verschieberichtungen  $N \cdot \vec{\Delta}(\kappa)$  sind in Abbildung H.2 als Funktion des Parameters  $\kappa$  gezeigt.



# I. Hexagonale SIM mit mehr als sieben Unbekannten

Analog zum Schachbrettmuster kann man auch beim hexagonalen Muster für mehr als 7 Unbekannte  $I^{(n)}$  (bzw.  $\Phi_0^{(n)}$ ) Verschiebewinkel  $\theta$  finden, unter denen eine optimal konditionierte Lösung der unbekannten Größen möglich ist. Alle in einem hexagonalen Muster enthaltenen Frequenzen aus Gleichung (4.28) können als Linearkombination von den in Abschnitt 4.2 definierten Vektoren  $\vec{k}^{(1)}$  und  $\vec{k}^{(2)}$  geschrieben werden:

$$\begin{aligned}\vec{k}_{m,n} &= p \underbrace{\vec{k}^{(1)}}_{\vec{k}_{0,2}} + q \underbrace{\vec{k}^{(2)}}_{\vec{k}_{1,-1}} \\ \frac{\pi}{p} \begin{pmatrix} \sqrt{3}m \\ n \end{pmatrix} &= \frac{\pi}{p} \begin{pmatrix} 0 \\ 2p \end{pmatrix} + \frac{\pi}{p} \begin{pmatrix} \sqrt{3}q \\ -q \end{pmatrix} \\ \left. \begin{matrix} m = q \\ n = 2p - m \end{matrix} \right\} &\Rightarrow \begin{matrix} q = m \in \mathbb{Z} \\ p = \frac{m+n}{2} \in \mathbb{Z} \end{matrix} \\ &\Rightarrow \vec{k}_{m,n} = \left( \frac{m+n}{2} \right) \vec{k}^{(1)} + m \vec{k}^{(2)}\end{aligned}$$

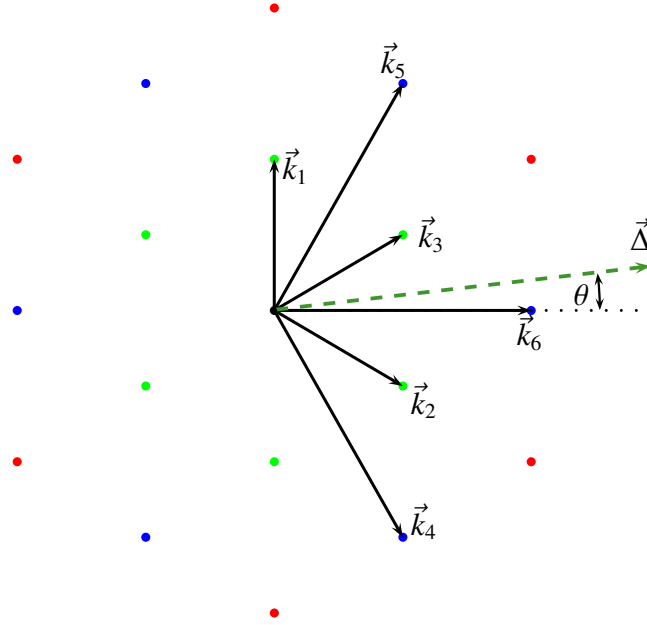
Aufgrund der Bedingung  $(m+n)$  gerade gilt  $p, q \in \mathbb{Z}$ . Für die Phasenverschiebungen der Frequenz  $\vec{k}_{m,n}$  im zweiten Rohbild  $\alpha_2^{(m,n)}$  folgt daraus:

$$\alpha_2^{(m,n)} = \vec{k}_{m,n} \vec{\Delta} = \left( \frac{m+n}{2} \right) \alpha_2^{(1)} + m \underbrace{\alpha_2^{(2)}}_{\kappa \alpha_2^{(1)}} = \left[ m \left( \kappa + \frac{1}{2} \right) + \frac{n}{2} \right] \alpha_2^{(1)}$$

Falls  $\kappa \in \mathbb{Z}$  gilt, sind die relativen Phasenverschiebungen aller Frequenzen des hexagonalen Musters aus Gleichung (4.28) durch ganzzahlige Vielfache der relativen Phasenverschiebung der Frequenz  $\vec{k}^{(1)}$  gegeben. Unter der Annahme, dass zwischen den Rohbildern immer dieselbe Verschiebung des Musters um  $\vec{\Delta}$  erfolgt und dass die Phasenverschiebung der Frequenz  $\vec{k}^{(1)}$  vom ersten zum zweiten Rohbild  $2\pi/N$  beträgt, ergibt sich für die Phasenverschiebung der

Frequenz  $(m, n)$  im  $q$ -ten Rohbild:

$$\alpha_q^{(m,n)} = (q-1) \left[ m \left( \kappa + \frac{1}{2} \right) + \frac{n}{2} \right] \frac{2\pi}{N} \quad (\text{I.1})$$



**Abb. I.1.:** Die Frequenzen des hexagonalen Musters bis  $N = 19$ . Die Grundfrequenzen sind grün, die nächste größere Frequenzen  $|\vec{k}| = \sqrt{3} \frac{2\pi}{p}$  blau, und die Frequenzen mit  $|\vec{k}| = \frac{4\pi}{p}$  rot eingezeichnet. Der Orientierungswinkel des eingezeichneten Verschiebevektors  $\vec{\Delta}$  ist gemäß Gleichung (I.6)  $\theta \approx 6,59^\circ$ .

**N=13**

Nach den Grundfrequenzen des hexagonalen Musters aus Gleichung (4.29) mit einem Betrag von  $|\vec{k}^{(n)}| = \frac{2\pi}{p}$  sind die nächst größere Frequenzen mit einem Betrag von  $|\vec{k}^{(n)}| = \sqrt{3} \frac{2\pi}{p}$  gegeben durch:

$$\vec{k}_{1,-3} = \frac{\pi}{p} \sqrt{3} \begin{pmatrix} 1 \\ -\sqrt{3} \end{pmatrix} =: \vec{k}^{(4)} \quad \vec{k}_{1,3} = \frac{\pi}{p} \sqrt{3} \begin{pmatrix} 1 \\ \sqrt{3} \end{pmatrix} =: \vec{k}^{(5)} \quad \vec{k}_{2,0} = \frac{2\pi}{p} \sqrt{3} \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} := \vec{k}^{(6)} \quad (\text{I.2})$$

Aus Gleichung (I.1) erhält man für die Phasenverschiebungen der  $n$ -ten Frequenz im  $m$ -ten Rohbild  $\alpha_m^n$ :

$$\alpha_m^{(4)} = (m-1)(-1+\kappa) \cdot \alpha_2^{(1)} \quad \alpha_m^{(5)} = (m-1)(2+\kappa) \cdot \alpha_2^{(1)} \quad \alpha_m^{(6)} = (m-1)(1+2\kappa) \cdot \alpha_2^{(1)}$$

Wie in Abschnitt 4.2 gibt es wieder 2 mögliche Werte für  $\kappa$ , die zu einer unitären Matrix  $\hat{A}$  führen:

$$\kappa_1 = 3 \qquad \kappa_2 = 9 \qquad (\text{I.3})$$

Daraus folgt für die Orientierungswinkel  $\theta$  des Verschiebevektors aus Gleichung (4.35):

$$\theta_1 = \arctan\left(\frac{\sqrt{3}}{7}\right) \approx 13,898^\circ \qquad \theta_2 = \arctan\left(\frac{\sqrt{3}}{19}\right) \approx 5,20^\circ$$

Für die entsprechenden Winkel  $\gamma_l = \theta_l - 90^\circ$  zwischen  $\vec{\Delta}$  und  $\vec{k}^{(1)}$  ergibt sich  $\gamma_1 \approx -76,102^\circ$  und  $\gamma_2 \approx -84,8^\circ$ . Für  $\kappa_1 = 3$  erhält man für die relativen Phasenverschiebungen  $\alpha_m^{(n)}$  insgesamt

$$\alpha_m^{(n)} = \underbrace{\frac{2\pi}{13}}_{\alpha_2^{(1)}} \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 12 & 3 & 10 & 4 & 9 & 2 & 11 & 5 & 8 & 7 & 6 \\ 0 & 2 & 11 & 6 & 7 & 8 & 5 & 4 & 9 & 10 & 3 & 1 & 12 \\ 0 & 3 & 10 & 9 & 4 & 12 & 1 & 6 & 7 & 2 & 11 & 8 & 5 \\ 0 & 4 & 9 & 12 & 1 & 3 & 10 & 8 & 5 & 7 & 6 & 2 & 11 \\ 0 & 5 & 8 & 2 & 11 & 7 & 6 & 10 & 3 & 12 & 1 & 9 & 4 \\ 0 & 6 & 7 & 5 & 8 & 11 & 2 & 12 & 1 & 4 & 9 & 3 & 10 \\ 0 & 7 & 6 & 8 & 5 & 2 & 11 & 1 & 12 & 9 & 4 & 10 & 3 \\ 0 & 8 & 5 & 11 & 2 & 6 & 7 & 3 & 10 & 1 & 12 & 4 & 9 \\ 0 & 9 & 4 & 1 & 12 & 10 & 3 & 5 & 8 & 6 & 7 & 11 & 2 \\ 0 & 10 & 3 & 4 & 9 & 1 & 12 & 7 & 6 & 11 & 2 & 5 & 8 \\ 0 & 11 & 2 & 7 & 6 & 5 & 8 & 9 & 4 & 3 & 10 & 12 & 1 \\ 0 & 12 & 1 & 10 & 3 & 9 & 4 & 11 & 2 & 8 & 5 & 6 & 7 \end{pmatrix} \qquad (\text{I.4})$$

$\hat{A}_{l,m} = \exp(-i\alpha_m^{(n)})$  stimmt damit bis auf einen Faktor mit der Fouriertransformationsmatrix  $\hat{W}$  aus Gleichung (A.7) überein.

## N=19

Die nächst größeren Frequenzvektoren im hexagonalen Muster haben eine Frequenz von  $|\vec{k}^{(n)}| = 2 \cdot \frac{2\pi}{p}$ :

$$\vec{k}^{(7)} := \vec{k}_{0,4} = 2\vec{k}^{(1)} \qquad \vec{k}^{(8)} := \vec{k}_{2,-2} = 2\vec{k}^{(2)} \qquad \vec{k}^{(9)} := \vec{k}_{2,2} = 2\vec{k}^{(3)}$$

Entsprechend Gleichung (I.1) kann man sich wieder die relativen Phasenverschiebungen der Frequenzen in Abhängigkeit des Parameters  $\kappa$  überlegen. Auch hier findet man zwei mögliche

Werte für  $\kappa$ , die zu einer unitären Matrix  $\hat{A}$  führen. Die beiden Werte sind

$$\kappa_1 = 7 \qquad \kappa_2 = 11 \qquad (I.5)$$

Aus Gleichung (4.35), folgen die zwei entsprechenden Winkel  $\theta$ :

$$\theta_1 = 6,59^\circ \qquad \theta_2 = 4,31^\circ \qquad (I.6)$$

Wenn für die normalisierte Frequenz des hexagonalen Musters gerade  $p_g = 1$  gewählt wird und das Muster kohärent beleuchtet wird, so werden die ersten Beugungsordnungen die Pupille des Mikroskopobjektivs an ihrem Rand passieren. Die sieben in der Probenebene des Mikroskops interferierenden Beugungsordnungen erzeugen eine Intensitätsverteilung, welche Modulationen mit allen neunzehn in Abbildung I.1 gezeigten Frequenzen enthält. Daher ist ein Orientierungswinkel  $\theta_1 = 6,59^\circ$  für (SR-)SIM mit kohärent beleuchteten hexagonalen Mustern, wie z.B. in den Abschnitten 4.2.3 bzw. 4.2.4 geeignet.

### Weitere Lösungen

Für den Fall, dass die Intensitätsverteilung im  $m$ -ten Rohbild weitere Frequenzanteile enthält existieren weitere Winkel unter denen eine optimal konditionierte Lösung der unbekannten Größen möglich ist. Insgesamt wurden entsprechende Werte  $\kappa$  bzw.  $\theta$  bis zu einer Anzahl von  $N = 127$  unbekannten Frequenzordnungen gefunden, welche in Tabelle I.1 zusammengefasst sind:

N	7	13	19	31	37	43	61	73	91	127
$\kappa_1$	2	3	7	5	10	6	13	8	16	19
$\kappa_2$	4	9	11	25	26	36	47	64	74	107
$ \vec{k} _{\max}/\frac{2\pi}{p}$	1	$\sqrt{3}$	2	$\sqrt{7}$	3	$2\sqrt{3}$	4	$\sqrt{19}$	5	6
$\theta_1 [^\circ]$	19,11	13,90	6,59	8,95	4,72	7,59	3,67	5,82	3,00	2,54
$\theta_2 [^\circ]$	10,89	5,21	4,31	1,95	1,87	1,36	1,04	0,77	0,67	0,46

**Tabelle I.1.:** Zusammenfassung aller Verschiebewinkel  $\theta$  für das hexagonale Muster.

Die Matrix  $\hat{A}$  wurde bei den Lösungen mit  $N > 19$  analog zu dem in Abschnitt 4.1 bzw. 4.2 beschriebenen Verfahren konstruiert. Die Konstruktion der unitären Matrizen wurde wie in Anhang H beschrieben mit der Software *Matlab* automatisiert. Für den Wertebereich ( $127 < N < 1000$ ) existieren keine weiteren Lösungen die zu unitären Matrizen  $\hat{A}$  führen. Die bis zum Wert  $N = 127$  vorkommenden Frequenzvektoren sind in Tabelle I.2 zusammengefasst.

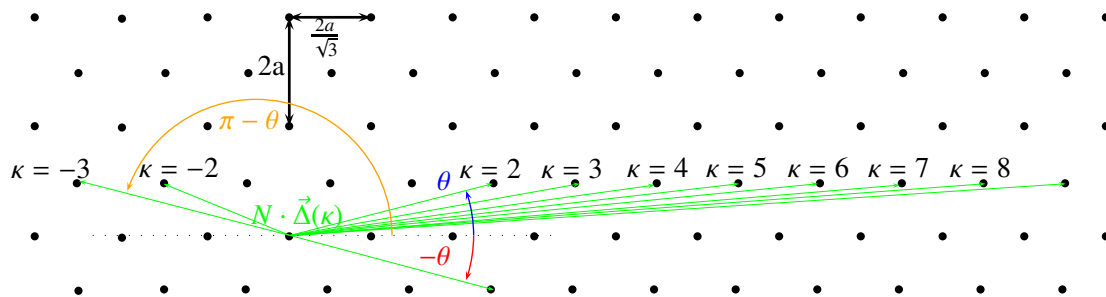


$\vec{k}_1 = \vec{k}_{0,2}$	$\vec{k}_{12} = \vec{k}_{2,4}$	$\vec{k}_{23} = \vec{k}_{4,-2}$	$\vec{k}_{34} = \vec{k}_{3,-7}$	$\vec{k}_{45} = \vec{k}_{0,10}$	$\vec{k}_{56} = \vec{k}_{6,-4}$
$\vec{k}_2 = \vec{k}_{1,-1}$	$\vec{k}_{13} = \vec{k}_{2,-4}$	$\vec{k}_{24} = \vec{k}_{3,5}$	$\vec{k}_{35} = \vec{k}_{2,8}$	$\vec{k}_{46} = \vec{k}_{6,0}$	$\vec{k}_{57} = \vec{k}_{5,7}$
$\vec{k}_3 = \vec{k}_{1,1}$	$\vec{k}_{14} = \vec{k}_{1,5}$	$\vec{k}_{25} = \vec{k}_{3,-5}$	$\vec{k}_{36} = \vec{k}_{2,-8}$	$\vec{k}_{47} = \vec{k}_{3,9}$	$\vec{k}_{58} = \vec{k}_{5,-7}$
$\vec{k}_4 = \vec{k}_{2,0}$	$\vec{k}_{15} = \vec{k}_{1,-5}$	$\vec{k}_{26} = \vec{k}_{1,7}$	$\vec{k}_{37} = \vec{k}_{5,3}$	$\vec{k}_{48} = \vec{k}_{3,-9}$	$\vec{k}_{59} = \vec{k}_{1,11}$
$\vec{k}_5 = \vec{k}_{1,3}$	$\vec{k}_{16} = \vec{k}_{3,3}$	$\vec{k}_{27} = \vec{k}_{1,-7}$	$\vec{k}_{38} = \vec{k}_{5,-3}$	$\vec{k}_{49} = \vec{k}_{6,2}$	$\vec{k}_{60} = \vec{k}_{1,-11}$
$\vec{k}_6 = \vec{k}_{1,-3}$	$\vec{k}_{17} = \vec{k}_{3,-3}$	$\vec{k}_{28} = \vec{k}_{4,4}$	$\vec{k}_{39} = \vec{k}_{4,6}$	$\vec{k}_{50} = \vec{k}_{6,-2}$	$\vec{k}_{61} = \vec{k}_{6,6}$
$\vec{k}_7 = \vec{k}_{2,2}$	$\vec{k}_{18} = \vec{k}_{0,6}$	$\vec{k}_{29} = \vec{k}_{4,-4}$	$\vec{k}_{40} = \vec{k}_{4,-6}$	$\vec{k}_{51} = \vec{k}_{4,8}$	$\vec{k}_{62} = \vec{k}_{6,-6}$
$\vec{k}_8 = \vec{k}_{2,-2}$	$\vec{k}_{19} = \vec{k}_{4,0}$	$\vec{k}_{30} = \vec{k}_{0,8}$	$\vec{k}_{41} = \vec{k}_{1,9}$	$\vec{k}_{52} = \vec{k}_{4,-8}$	$\vec{k}_{63} = \vec{k}_{0,12}$
$\vec{k}_9 = \vec{k}_{0,4}$	$\vec{k}_{20} = \vec{k}_{2,6}$	$\vec{k}_{31} = \vec{k}_{5,1}$	$\vec{k}_{42} = \vec{k}_{1,-9}$	$\vec{k}_{53} = \vec{k}_{2,10}$	
$\vec{k}_{10} = \vec{k}_{3,1}$	$\vec{k}_{21} = \vec{k}_{2,-6}$	$\vec{k}_{32} = \vec{k}_{5,-1}$	$\vec{k}_{43} = \vec{k}_{5,5}$	$\vec{k}_{54} = \vec{k}_{2,-10}$	
$\vec{k}_{11} = \vec{k}_{3,-1}$	$\vec{k}_{22} = \vec{k}_{4,2}$	$\vec{k}_{33} = \vec{k}_{3,7}$	$\vec{k}_{44} = \vec{k}_{5,-5}$	$\vec{k}_{55} = \vec{k}_{6,4}$	

**Tabelle I.2.:** Zusammenfassung aller bis  $N = 127$  vorkommenden Frequenzvektoren des hexagonalen Musters in aufsteigender Reihenfolge nach den Beträgen  $|\vec{k}_{m,n}| = \frac{\pi}{p} \sqrt{3m^2 + n^2}$  sortiert.

Die Verschiebevektoren als Funktion des Parameters  $\kappa$  sind in Abbildung I.2 dargestellt. Bei der Wahl von  $\alpha_2^{(1)} = \frac{2\pi}{7}$ , führen  $(N - 1)$  Verschiebungen zu einer Gesamtverschiebung von  $p = \frac{p}{2} \sqrt{3}$  in  $\vec{k}^{(1)}$ - bzw.  $y$ -Richtung unabhängig von  $\kappa$ . Es ist anschaulich klar, dass bei der Wahl eines beliebigen, genügend großen Wertes für  $\kappa$ , alle Punkte der Probe durch die Anregungsintensität gleichermaßen abgetastet werden. Die Besonderheit an den in Tabelle I.1 aufgeführten Werten für  $\kappa$  (bzw.  $\theta$ ) ist, dass jeder der  $N$  in der Anregungsintensität enthaltenen Frequenzordnungen mit einer eindeutigen Phasenverschiebung von einem zum darauf folgenden Rohbild eindeutig „markiert“ wird.

## I.1. Symmetriebetrachtungen



**Abb. I.2.:** Die Verschiebevektoren  $\vec{\Delta}$  bei hexagonaler SIM als Funktion des Parameters  $\kappa$ .

Betrachtet man die Zusammenfassung aller Orientierungswinkel  $\theta$  für den Verschiebevektor  $\vec{\Delta}$  unter denen eine optimal konditionierte Trennung der Frequenzbänder möglich ist, so stellt sich die Frage, warum für jeden Wert  $N$  genau zwei Werte für  $\theta$  existieren. Tatsächlich gibt es nicht nur zwei mögliche Orientierungen für den Winkel  $\theta$ , sondern abzählbar unendlich viele. Im Folgenden werden die verschiedenen Möglichkeiten erläutert.

Zunächst können die Frequenzvektoren beliebig indiziert werden, d.h. jeder der drei Grundfrequenzvektoren kann als  $\vec{k}^{(1)}$  gewählt werden. Das bedeutet, dass statt den in Tabelle I.1 genannten Winkeln  $\theta$  auch  $\theta + n60^\circ$ ,  $n \in \mathbb{Z}$  für die Orientierung von  $\vec{\Delta}$  gewählt werden kann. Mit anderen Worten, lässt die Transformation

$$\theta \mapsto \theta + p60^\circ, p \in \mathbb{Z} \quad (\text{I.7})$$

die Matrix  $\hat{A}$  invariant. Da die Tangensfunktion nur auf dem Winkelintervall  $[-180^\circ; 180^\circ]$  invertierbar ist, lässt auch die Transformation

$$\theta \mapsto \theta \pm p180^\circ, p \in \mathbb{Z} \quad (\text{I.8})$$

die Matrix  $\hat{A}$  invariant.

Die Werte von  $\kappa$  legen per Definition die Phasenverschiebungen der Frequenz  $\vec{k}^{(2)}$  relativ zu  $\vec{k}^{(1)}$  fest. Eine Spiegelung des Musters bzw. des Verschiebevektor  $\vec{\Delta}$  an  $\vec{k}^{(1)}$ , lässt die Matrix  $\hat{A}$  bis auf die Vertauschung einzelner Spalten invariant. Hierbei werden die Frequenzvektoren und  $\kappa$  bzw.  $\theta$  folgendermaßen transformiert:

$$\begin{aligned} \vec{k}^{(2)} &\mapsto -\vec{k}^{(3)} \\ \vec{k}^{(3)} &\mapsto -\vec{k}^{(2)} \\ \kappa &\mapsto -1 - \kappa \end{aligned} \quad (\text{I.9})$$

$$\Rightarrow \theta \mapsto 180^\circ - \theta \quad (\text{I.10})$$

Die Kombination von (I.10) und (I.8) entspricht der Transformation

$$\theta \mapsto -\theta, \quad (\text{I.11})$$

d.h. anschaulich einer Spiegelung des Verschiebevektors an der  $x$ -Achse (siehe Abbildung I.2).

In Abschnitt 4.2 wurde zunächst davon ausgegangen, dass  $\kappa$  immer Werte zwischen 0 und  $N$  annimmt. Wird der Betrag des Verschiebevektors – wie in Abschnitt 4.2 – so gewählt, dass  $\alpha_2^{(1)} = \frac{2\pi}{N}$ , so bleibt die Matrix  $\hat{A}$  auch unter der Transformation

$$\kappa \mapsto \kappa \pm pN \quad (\text{I.12})$$

invariant, wobei  $p \in \mathbb{Z}$  eine beliebige ganze Zahl ist. Für jeden in Tabelle I.1 aufgeführten Wert  $\kappa$ , existiert daher mit

$$\kappa = \kappa_{1,2} \pm pN, p \in \mathbb{Z}$$

eine Menge von abzählbar unendlich vielen Werten für  $\kappa$  (und damit auch für  $\theta$ ), für die die Matrix  $\hat{A}$  unitär ist. Zusammengefasst ergibt sich für den Winkel  $\theta$

$$\theta = \pm \arctan\left(\frac{\sqrt{3}}{2\kappa \pm 2qN + 1}\right) \pm p60^\circ, p, q \in \mathbb{Z} \quad (\text{I.13})$$

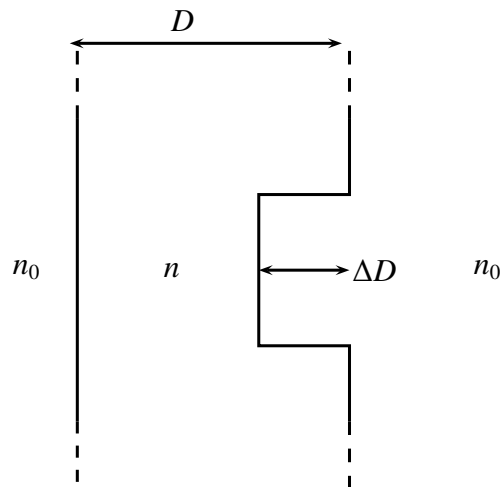
Die Kombination von (I.9) und (I.12) mit  $p = 1$  ergibt den Zusammenhang zwischen den in Tabelle I.1 aufgeführten Werten für  $\kappa_1$  und  $\kappa_2$ :

$$\kappa_2 = -1 - \kappa_1 + N = N - 1 - \kappa_1 \quad (\text{I.14})$$



## J. Hexagonale Phasenmuster

In diesem Abschnitt wird die Gestaltung der in der Arbeit verwendeten hexagonalen Phasenmuster für die strukturierte Beleuchtung erläutert. Im Gegensatz zu einem Amplitudenmuster, welches beispielsweise durch eine Chromschicht auf Quarzglas realisiert sein kann, wird durch ein Phasenmuster nicht die Amplitude sondern die Phase der auf das Muster einfallenden Welle moduliert. Ein solches Phasenmuster kann zum Beispiel ein Glassubstrat sein, in dessen optische Dicke über die Fläche des Substrates ein hexagonales Muster moduliert ist, wie in Abbildung J.1 schematisch gezeigt ist.



**Abb. J.1.:** Phasenmodulation durch ein Phasenmuster: Die durch das Phasenmuster-Substrat transmittierte Welle wird lokal durch den Weglängenunterschied  $(n - n_0)\Delta D$  phasenverschoben.

### J.1. Berechnung der modulierten Amplitude

In Abbildung J.2 ist die Geometrie eines hexagonalen Phasenmusters gezeigt: Eine einfallende Lichtwelle erfährt für alle Punkte der Musterebene eine Phasenverschiebung  $\Phi_0 = \frac{2\pi}{\lambda}nD$ ,

welche von der Dicke  $D$  und dem Brechungsindex  $n$  des Glassubstrats abhängt. Innerhalb der grau gezeichneten Bereiche erfährt die Welle eine Verzögerung (bzw. Phasenverschiebung) von

$$\frac{2\pi}{\lambda}[n(D - \Delta D) + n_0\Delta D] = \underbrace{\frac{2\pi}{\lambda}nD}_{\Phi_0} - \underbrace{\frac{2\pi}{\lambda}(n - n_0)\Delta D}_{\Delta\Phi} .$$

In dieser Arbeit wurden die Bereiche der lokalen hexagonalen Phasenverschiebungen als kreisförmig gewählt. Wie in Abbildung J.2 angedeutet ist der eindimensionale Füllfaktor des Phasenmusters definiert als das Verhältnis aus dem Radius der grauen Kreise  $R$  und der Periode des hexagonalen Musters  $p$ . Der zweidimensionale Füllfaktor  $F_2$  ist durch das Verhältnis der grauen Flächen zur Gesamtfläche definiert. Zur Berechnung des zweidimensionalen Füllfaktors genügt es, eine hexagonale Einheitszelle (in Abbildung J.2 grün dargestellt) zu betrachten. Die gesamte Fläche des Hexagons entspricht gerade dem sechsfachen der Fläche des rot eingezeichneten Dreiecks

$$\mathcal{A}_{\text{hex}} = 6 \frac{d}{2} \frac{d}{2} \sqrt{3} = \frac{3}{2} d^2 \sqrt{3} = 2p^2 \sqrt{3}$$

Die Fläche der Kreise innerhalb des Hexagons beträgt

$$\mathcal{A}_{\text{circ}} = 3R^2\pi = 3(F_1 p)^2\pi .$$

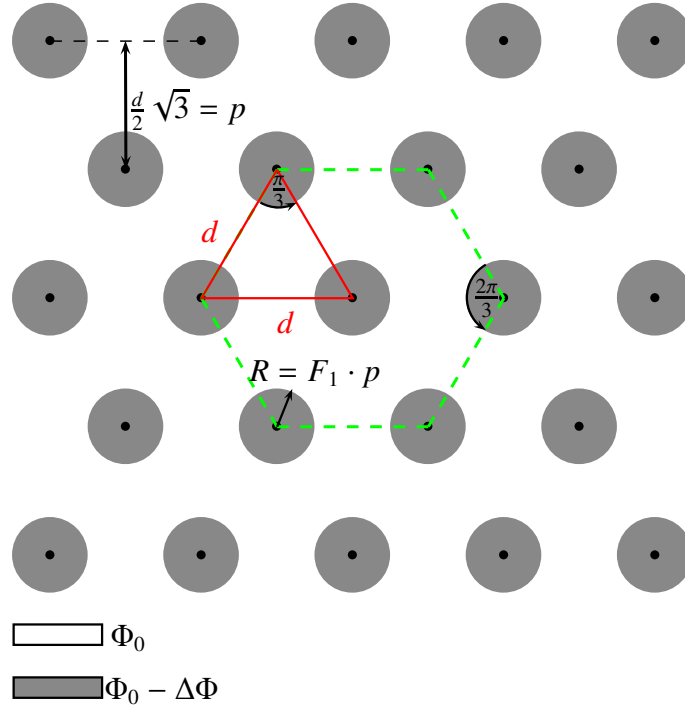
Daraus folgt der Zusammenhang zwischen dem eindimensionalen und dem zweidimensionalen Füllfaktor bei hexagonalen Mustern:

$$F_2 = \frac{\mathcal{A}_{\text{circ}}}{\mathcal{A}_{\text{hex}}} = \frac{\sqrt{3}}{2} F_1^2 \pi \Leftrightarrow F_1 = \sqrt{\frac{2F_2}{\sqrt{3}\pi}}$$

Es sei  $\mathcal{T}(\vec{x})$  eine Funktion, die nur innerhalb der grauen Bereiche von null verschieden ist und  $U_0$  die Amplitude der einfallenden Welle vor dem Phasenmuster. Dann lässt sich die phasenmodulierte Amplitude  $U(\vec{x}_\perp)$  der Welle nach dem Phasenmuster folgendermaßen schreiben:

$$\begin{aligned} U(\vec{x}_\perp) &= U_0 \cdot [e^{i\Phi_0} - \mathcal{T}(\vec{x})e^{i\Phi_0} + \mathcal{T}(\vec{x})e^{i(\Phi_0 - \Delta\Phi)}] \\ &= U_0 \cdot [e^{i\Phi_0} - \mathcal{T}(\vec{x})e^{i\Phi_0}(1 - e^{-i\Delta\Phi})] \end{aligned} \quad (\text{J.1})$$

Die grauen Bereiche in Abbildung J.2 lassen sich wie in Abschnitt 4.2 als Faltung einer Kreisfunktion mit der Summe zweier zweidimensionaler Dirac-Kämme schreiben. Dadurch wird



**Abb. J.2.:** Skizze zum hexagonalen Phasenmuster: Die grauen Bereiche des Musters verschieben die transmittierende Welle durch einen Weglängenunterschied lokal um eine Phasendifferenz  $\Delta\Phi$ . Eine hexagonale Einheitszelle ist grün eingezeichnet.

aus Gleichung (J.1):

$$U(\vec{x}_\perp) = U_0 e^{i\Phi_0} \cdot \left[ 1 - (1 - e^{-i\Delta\Phi}) \left( \sum_{m=-\infty}^{\infty} \sum_{n=-\infty}^{\infty} \delta(x - md) \delta(y - nd \sqrt{3}) + \sum_{m=-\infty}^{\infty} \sum_{n=-\infty}^{\infty} \delta(x - \left(m + \frac{1}{2}\right)d) \delta(y - \left(n + \frac{1}{2}\right)d \sqrt{3}) \right) * \text{circ}\left(\frac{|\vec{x}_\perp|}{R}\right) \right] \quad (\text{J.2})$$

Der Radius der kreisförmigen Bereiche  $R$  ist wie in der Zeichnung gegeben durch das Produkt aus Periode und dem *eindimensionalen* Füllfaktor  $F_1 = R/p$ .

Zunächst wird für das zu bestimmende Phasenmuster ein Phasensprung von  $\Delta\Phi = \pi$  angenommen, d.h. die Wellenanteile welche durch die grauen Zonen in Abbildung J.2 transmittieren sind gegenüber den anderen Wellenanteilen um eine halbe Wellenlänge verzögert:  $(n - n_0)\Delta D = \frac{\lambda}{2}$

In diesem Fall wird aus (J.2):

$$U(\vec{x}_\perp) = U_0 e^{i\Phi_0} \cdot \left[ 1 - 2 \left( \sum_{m=-\infty}^{\infty} \sum_{n=-\infty}^{\infty} \delta(x - md) \delta(y - nd \sqrt{3}) + \sum_{m=-\infty}^{\infty} \sum_{n=-\infty}^{\infty} \delta(x - \left(m + \frac{1}{2}\right)d) \delta(y - \left(n + \frac{1}{2}\right)d \sqrt{3}) \right) * \text{circ}\left(\frac{|\vec{x}_\perp|}{R}\right) \right] \quad (\text{J.3})$$

Wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, kann die kohärente Abbildung des Phasenmusters auf die mikroskopische Probe durch Faltung mit der Amplituden-PSF beschrieben werden. Äquivalent dazu, kann die Amplitude des Musters in der mikroskopischen Probe berechnet werden, indem die Fouriertransformierte der Amplitude  $\tilde{U}(\vec{k}_\perp)$  mit der Pupillenfunktion multipliziert, und das Produkt in den Ortsraum zurücktransformiert wird.

Die Fouriertransformierte der Amplitude in Gleichung (J.3) ist gegeben durch:

$$\begin{aligned} \tilde{U}(\vec{k}_\perp) = & U_0 \left( \delta(\vec{k}_\perp) - 2 \left\{ \frac{1}{(2\pi)^2} \overbrace{\frac{1}{2p^2 \sqrt{3}}}^{\mathcal{A}_{\text{hex}}} \left[ 1 + e^{-i(k_x \frac{d}{2} + k_y \frac{d}{2} \sqrt{3})} \right] \times \right. \right. \\ & \times \sum_{m=-\infty}^{\infty} \sum_{n=-\infty}^{\infty} \delta(k_x - m \frac{2\pi}{d}) \delta(k_y - n \frac{2\pi}{d \sqrt{3}}) \underbrace{3(F_1 p)^2}_{\mathcal{A}_{\text{circ}}} \pi \frac{2J_1(|\vec{k}_\perp| F_1 p)}{\underbrace{|\vec{k}_\perp| F_1 p}_{\text{jinc}(|\vec{k}_\perp| F_1 p)}} \left. \right\} \end{aligned} \quad (\text{J.4})$$

Rücktransformation von Gleichung (J.4) in den Ortsraum ergibt:

$$\begin{aligned} U(\vec{x}) &= U_0 \left[ 1 - 2F_2 \sum_{\substack{m,n \\ (m+n)\text{gerade}}} \overbrace{\text{jinc}(|\vec{k}_{m,n}| F_1 p)}^{(4.28)} e^{i[m \frac{2\pi}{d} + n \frac{2\pi}{d \sqrt{3}}]} \right] \\ &= U_0(1 - 2F_2) - 2U_0 F_2 \sum_{\substack{m,n \neq 0 \\ (m+n)\text{gerade}}} \text{jinc}(\pi \sqrt{3m^2 + n^2} F_1) e^{i[m \frac{\sqrt{3}\pi}{p} + n \frac{\pi}{p}]} \end{aligned} \quad (\text{J.5})$$

Üblicherweise wird die Frequenz des hexagonalen Musters bei der SR-SIM – wie in Abschnitt 4.2 beschrieben – gerade so gewählt, dass ausser der Nullfrequenz (jeweils der erste Term in Gleichungen (J.4) bzw. (J.5)) nur die Frequenzen mit den niedrigsten Beträgen (die Grundfrequenzen des Musters) die Pupille des Mikroskopobjektivs passieren können. Die Fourierkoeffizienten der Amplitude  $c_n$  aus Gleichung (J.5) lauten für die nullte und ersten Ordnungen der Fourierentwicklung:

$$c_0 = U_0(1 - 2F_2) \quad (\text{J.6})$$

$$c_{\pm 1} = -2U_0 F_2 \text{jinc}\left(\sqrt{\frac{8F_2 \pi}{\sqrt{3}}}\right) \quad (\text{J.7})$$

Die Betragsquadrate der Koeffizienten  $c_0$  und  $c_{\pm 1}$  entsprechen den Intensitäten der Beugungsordnungen in der Pupillenebene des Mikroskopobjektivs. Wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben, wird bei der SR-SIM in 2D bei einem Phasensprung von  $\pi$  ein zweidimensionaler Füllfaktor von  $F_2 = 1/2$  gewählt, da aufgrund von  $c_0 = 0$  in (J.6) in diesem Fall die Amplitude der nullten Beugungsordnung verschwindet. Die Intensität des Musters in der Probe entsteht daher



nur aus der Interferenz der ersten Beugungsordnungen. In der Realität werden die Fehler des Füllfaktors, der Wellenlänge, des Brechungsindex  $n$  bzw.  $n_0$  sowie die Stufe des Phasenmusters  $\Delta D$  dazu führen, dass die Intensität der nullten Beugungsordnung nicht exakt gleich null ist. Daher ist es üblich – wie z.B. in [Gus00a] bzw. [Gus00b] – auch bei Verwendung eines Phasenmusters die nullte Beugungsordnung mit Hilfe von Blenden zu blockieren. (Dies ist auch bei Verwendung von Amplitudenmustern für die SR-SIM wie z.B. in [Hei99] beschrieben üblich.)

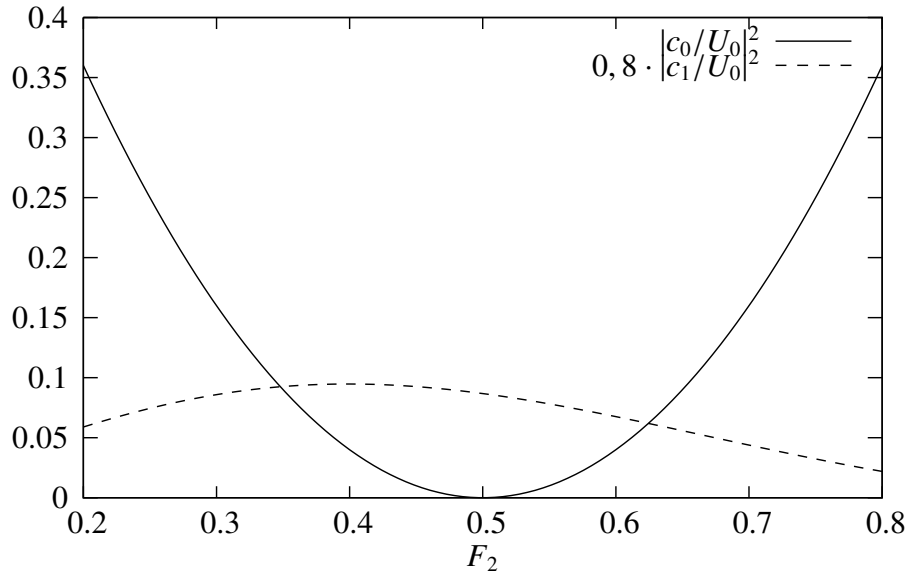
Für die SR-SIM in drei Dimensionen, wie in den Abschnitten 3.3.3 bzw. 4.2.4 beschrieben, ist es notwendig, dass auch die nullte Ordnung zur Bildentstehung des Anregungsmusters in der Probe beiträgt. Für die hexagonale SR-SIM mit Phasenmustern, wird analog zu [Gus08] ein Füllfaktor gewählt, bei dem die Intensität der nullten Beugungsordnung etwa 80% der Intensität der ersten Beugungsordnungen beträgt. Aufgrund der größeren Winkel mit der die Wellenanteile der ersten Beugungsordnungen auf die brechenden Flächen des Mikroskopobjektivs treffen, ist für die ersten Beugungsordnungen eine geringere Transmission durch das Objektiv zu erwarten. Daher sollten – falls die Intensität der ersten Beugungsordnungen etwa 80% der Intensität der nullten Beugungsordnung beträgt – alle Beugungsordnungen mit etwa der gleichen Amplitude bzw. Intensität im mikroskopischen Objekt interferieren. Für den dafür notwendigen zweidimensionalen Füllfaktor gibt es wie in Abbildung J.3 gezeigt zwei Möglichkeiten:

$$F_2 \approx 0,35$$

$$F_2 \approx 0,63$$

## J.2. Phasenmuster mit beliebigem Phasensprung $\Delta\Phi$

Bisher wurde bei den Phasenmustern ein optischer Weglängenunterschied  $(n - n_0)\Delta D = \lambda/2$  angenommen, der bei der Wellenlänge  $\lambda$  eine Phasendifferenz von  $\pi$  verursacht. Im Prinzip stellt sich natürlich die Frage, warum man das gewünschte Verhältnis der Intensitäten der Beugungsordnungen nicht durch Variation des Phasensprungs  $\Delta\Phi$  anstelle des Füllfaktors  $F_2$  einstellen kann. Zur Beantwortung dieser Frage wird zunächst eine beliebige Phasendifferenz  $\Delta\Phi$  angenommen. In diesem Fall ergibt sich für die Amplitude der Anregung der Objektebene



**Abb. J.3.:** Die Intensitäten der nullten und ersten Beugungsordnungen des hexagonalen Phasenmusters in der Pupillenebene des Mikroskopobjektivs. Die Intensität der ersten Beugungsordnungen wurde mit einem Faktor von 0,8 multipliziert, um die für die SR-SIM in 3 Dimensionen möglichen Füllfaktoren  $F_2$  für das hexagonale Phasenmuster zu bestimmen. Die ermittelten Füllfaktoren betragen  $F_2 \approx 0,35$  und  $F_2 \approx 0,63$ .

des Mikroskopobjektivs:

$$\begin{aligned}
 U(\vec{x}) &= U_0 \left( 1 + (e^{i\Delta\Phi} - 1)F_2 \sum_{\substack{m,n \\ (m+n)\text{gerade}}} \overbrace{\text{jinc}(|\vec{k}_{m,n}| F_1 p)}^{(4.28)} e^{i\left[m\frac{2\pi}{d} + n\frac{2\pi}{d\sqrt{3}}\right]} \right) \\
 &= U_0(1 + (e^{i\Delta\Phi} - 1)F_2) + (e^{i\Delta\Phi} - 1)U_0F_2 \sum_{\substack{m,n \neq 0 \\ (m+n)\text{gerade}}} \text{jinc}(\pi \sqrt{3m^2 + n^2} F_1) e^{i\left[m\frac{\sqrt{3}\pi}{p} + n\frac{\pi}{p}\right]}
 \end{aligned}$$

Daraus folgt unmittelbar für die Fourierkoeffizienten der Amplitude  $U(\vec{x}_\perp)$ :

$$\begin{aligned}
 c_0 &= U_0(1 + F_2(e^{i\Delta\Phi} - 1)) \\
 c_{\pm 1} &= U_0F_2(e^{i\Delta\Phi} - 1)\text{jinc}\left(\sqrt{\frac{8F_2\pi}{\sqrt{3}}}\right)
 \end{aligned}$$

Die Absolutbeträge und komplexe Phasen der Koeffizienten  $c_0$  und  $c_{\pm 1}$  sind:

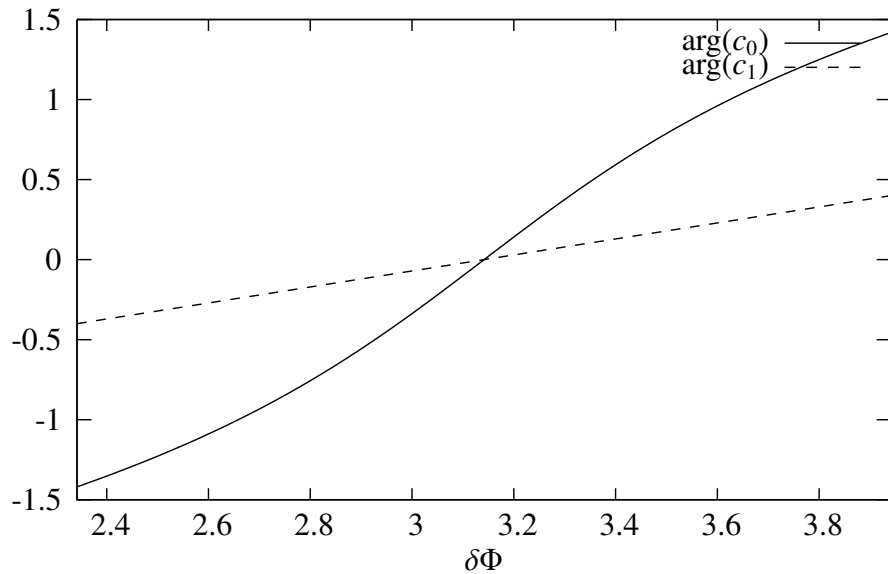
$$\begin{aligned} |c_0| &= U_0 \sqrt{(1 - F_2^2) + 2(1 - F_2)F_2 \cos(\Delta\Phi) + F_2^2} \\ \arg(c_0) &= \arctan\left(\frac{F_2 \sin(\Delta\Phi)}{(1 - F_2) + F_2 \cos(\Delta\Phi)}\right) \end{aligned} \quad (\text{J.8})$$

$$\begin{aligned} |c_{\pm 1}| &= U_0 \sqrt{2(1 - \cos(\Delta\Phi))} F_2 \text{jinc}\left(\sqrt{\frac{8F_2\pi}{\sqrt{3}}}\right) \\ \arg(c_{\pm 1}) &= \arctan\left(\frac{\sin(\Delta\Phi)}{\cos(\Delta\Phi) - 1}\right) = -\arctan\left(\cotan\left(\frac{\Delta\Phi}{2}\right)\right) \end{aligned} \quad (\text{J.9})$$

Aus den Phasen der Fourierkoeffizienten  $c_0$  und  $c_{\pm 1}$  in Gleichungen (J.8) und (J.9) sieht man, dass eine Abweichung des Phasensprungs  $\Delta\Phi$  des Phasenmusters vom Wert  $\pi$  (bzw. eines Vielfachen von  $\pi$ ) zu einer Phasenverschiebung bzw. einem Gangunterschied der Beugungsordnungen, die die Objektvpupille passieren führt. Wie in Abschnitt 2.3 erläutert, führt eine Phasenverschiebung der Beugungsordnungen zueinander zu einer Fokusverschiebung des Musterbildes.

Insgesamt bedeutet das: Falls der Phasensprung den das Phasenmuster bei einer transmittierenden Welle verursacht vom Wert  $\pi$  abweicht, führt das zu einer Fokusverschiebung des erzeugten Musters. Dementsprechend führt eine Abweichung der Wellenlänge, der Brechungsindizes und der Stufe des Phasenmusters  $\Delta D$  zur einer Verschiebung der Fokus-Position des Musters bzw. genauer der Ebene mit maximalem Musterkontrast.

Nimmt man räumlich total kohärente Wellen an (vgl. Abschnitt 2.4.5), so existiert im Gegensatz zu inkohärenter Beleuchtung nicht nur eine Ebene mit maximalem Kontrast. Im Fall total kohärenter Beleuchtung existieren unendlich viele Ebenen mit maximalem Kontrast, deren Abstand in axialer Richtung durch die Talbot-Distanz (siehe Gleichung (2.46)) bestimmt ist. In der Realität werden die Lichtwellen der Beleuchtung partiell kohärent sein, wodurch die Fokusebenen des Musters auf einen endlichen räumlichen Bereich reduziert werden. Darüber hinaus können z.B. auch Maßnahmen getroffen werden, welche die räumliche Kohärenz absichtlich reduzieren um die räumliche Ausdehnung der Fokusbereiche zu reduzieren, wie z.B. in [Gus08] beschrieben.



**Abb. J.4.:** Verlauf der komplexen Argumente von  $c_0$  und  $c_{\pm 1}$ . Für den Füllfaktor wurde ein Wert von  $F_2 \approx 0,63$  gewählt. Bei einer Abweichung des Phasensprungs  $\Delta\Phi$  vom Wert  $\pi$  ergibt sich eine Phasendifferenz bzw. ein Laufzeitunterschied zwischen der 0. und  $\pm 1$ . Beugungsordnung des Phasenmusters.

### J.3. Abschätzung der Fokusverschiebung durch Fehler des Phasenmusters

Zusätzlich zu den üblichen Unsicherheiten der Fokusposition des Musters (z.B. Fehler in den Brennweiten der verwendeten Linsen, chromatische Längsfehler, etc...) muss hier u.U. auch der Fehler der Fokusposition berücksichtigt werden, der von dem Fehler des durch das Phasenmuster verursachten Phasensprungs stammt. Aus Gleichung (2.40) folgt der Zusammenhang zwischen der Fokusverschiebung  $z$  und der optischen Weglängendifferenz (bzw. der Phasendifferenz) der Wellen zwischen dem Rand und dem Zentrum der Pupille:

$$z(\Phi_d) = \frac{\Phi_d^2 + 2\Phi_d k f}{2k(fk(1 - \cos(\alpha)) + \cos(\alpha)\Phi_d)} \quad (\text{J.10})$$

$f$  bezeichnet wieder die Brennweite des Mikroskopobjektivs,  $\alpha$  der maximale Öffnungswinkel und  $k$  die Wellenzahl des verwendeten Anregungslichts. Aus (J.10) folgt für den Fehler  $\delta z$  der Fokusposition:

$$\begin{aligned} \delta z &= \left| \frac{\partial z}{\partial \Phi_d} \right|_{\Delta\Phi=\pi} \delta\Phi_d(F_2, \Delta\Phi) = \\ &= \left| \frac{2kf(kf + \Phi_d) - (2f^2k^2 + 2fk\Phi_d + \Phi_d^2)\cos(\alpha)}{2k[fk - (fk + \Phi_d)\cos(\alpha)]^2} \right|_{\Delta\Phi=\pi} \delta\Phi_d = \left| \frac{1}{2k(1 - \cos(\alpha))} \right| \delta\Phi_d \end{aligned}$$

Aus (J.8) und (J.9) folgt die Defokusphase  $\Phi_d$  für hexagonale Phasenmuster:

$$\begin{aligned}\Phi_d &= \arg(c_1) - \arg(c_0) = -\arctan\left(\cotan\left(\frac{\Delta\Phi}{2}\right)\right) - \arctan\left(\frac{F_2 \sin(\Delta\Phi)}{(1 - F_2) + F_2 \cos(\Delta\Phi)}\right) \\ \Rightarrow \left|\frac{\partial\Phi_d}{\partial F_2}\right|_{\Delta\Phi=\pi} &= \left|\frac{\sin(\Delta\Phi)}{-1 + 2F_2(F_2 - 1)(\cos(\Delta\Phi) - 1)}\right|_{\Delta\Phi=\pi} = 0 \\ \left|\frac{\partial\Phi_d}{\partial\Delta\Phi}\right|_{\Delta\Phi=\pi} &= \frac{1}{2} \left|\frac{F_2 - 1}{-1 + 2F_2(F_2 - 1)[\cos(\Delta\Phi) - 1]}\right|_{\Delta\Phi=\pi} = \frac{1}{2} \left|\frac{F_2 - 1}{1 + 4F_2(F_2 - 1)}\right|\end{aligned}$$

Die durch den Fehler des Phasensprungs  $\Delta\Phi$  und des Füllfaktors  $F_2$  des Musters verursachten Fehler der Defokusphase  $\delta\Phi_d$  lautet daher:

$$\begin{aligned}\delta\Phi_d(F_2, \Delta\Phi) &= \left|\frac{\partial\Phi_d}{\partial F_2}\right|_{\Delta\Phi=\pi} \delta F_2 + \left|\frac{\partial\Phi_d}{\partial\Delta\Phi}\right|_{\Delta\Phi=\pi} \delta\Delta\Phi \\ &= \frac{1}{2} \left|\frac{F_2 - 1}{1 + 4F_2(F_2 - 1)}\right| \underbrace{\delta\Delta\Phi}_{k\delta\Delta D + k\Delta D \frac{\delta\lambda}{\lambda}}\end{aligned}$$

Für den Fehler der Fokusposition  $\delta z$  folgt daraus:

$$\delta z = \frac{1}{2} \left|\frac{F_2 - 1}{k(1 - \cos(\alpha))(1 + 4F_2(F_2 - 1))}\right| \left(k\delta\Delta D + k\Delta D \frac{\delta\lambda}{\lambda}\right) \quad (\text{J.11})$$

Für den fertigungsbedingten Fehler der Stufe in den Mustern  $\Delta D$  kann man in etwa  $\delta D \leq 50nm$ , für den relativen Fehler der Wellenlänge  $\delta\lambda/\lambda$  etwa  $1/50 = 0,02$  annehmen. Ansonsten wird eine Wellenlänge von  $\lambda \approx 490nm$ , ein Brechungsindex von 1,518 und ein Beugungswinkel  $\alpha \approx 67,3^\circ$  angenommen. Für den Ausdruck innerhalb der Klammer rechts von (J.11) folgt daraus:

$$\underbrace{k\delta\Delta D}_{\approx \frac{\pi}{5}} + \underbrace{k\Delta D \frac{\delta\lambda}{\lambda}}_{\approx \frac{\pi}{50}}$$

Da der Ausdruck innerhalb der Betragsstriche in Gleichung (J.11) für einen Füllfaktor von  $F_2 \approx 0,63$  einen etwas kleineren Beitrag ergibt als für den Wert  $F_2 \approx 0,35$ , wäre es vorteilhaft, hier den Wert  $F_2 \approx 0,63$  für den Füllfaktor zu wählen, wenn man nur die Fokusverschiebung durch die Fehler des Musters berücksichtigt. Da die Intensitäten der 0. und ersten Beugungsordnungen für  $F_2 \approx 0,35$  insgesamt größer sind, ist es dennoch besser diesen Wert für das Phasenmuster zu wählen.

Insgesamt erhält man für die Fehlergrenze der Fokusposition  $\delta z$ :

$$\delta z \leq 0,222\mu m \cdot 0,693 \approx 154nm$$

Wie zu erwarten ist der Beitrag des Fehlers der Phasenstufe  $\Delta D$  zum Gesamtfehler deutlich größer als der Fehler der Wellenlänge. Im schlimmsten anzunehmenden Fall beträgt die Verschiebung der Fokusposition durch die Fehler des Phasenmusters in der Probe etwa  $150nm$ .



## K. Polarisation

Im Folgenden wird der Einfluss der Polarisation bei der monochromatischen Abbildung eines hexagonalen Phasenmusters bzw. bei der interferometrischen Erzeugung eines hexagonalen Intensitätsmusters aus insgesamt 7 Wellenanteilen erläutert. Wie in Abschnitt 2.4.5, verursacht die Brechung der gebeugten Wellenfront an Glasflächen des Objektivs eine Drehung der elektrischen Feldstärkevektoren, um die Achse senkrecht zur jeweiligen Meridionalebene der Beugungsordnung. Die Meridionalebene der jeweiligen Beugungsordnung ist diejenige Ebene, die die optische Achse und die Ausbreitungsrichtung der Beugungsordnung ( $\vec{k}^{(n)}$ ) enthält. Die Rekombination der polarisierten Beugungsordnungen kann durch einen auf drei Dimensionen verallgemeinerten *Jones-Formalismus* beschrieben werden. Siehe hierzu z.B. [For10].

### K.1. Berechnung der Feldstärkevektoren für die hexagonalen Beugungsordnungen

Die Fläche des SIM Phasenmusters wird durch die Tubuslinse des Mikroskop-Anregungsstrahlenganges und das Mikroskopobjektiv auf die Probe abgebildet. Hierbei wird die Fläche des Phasenmusters verkleinert, während die Beugungswinkel  $\alpha$  der Beugungsordnungen in der Probe entsprechend vergrößert sind. Die elektrischen Feldstärkevektoren der Beugungsordnungen werden bei Rekombination durch das Objektiv dementsprechend um einen nicht zu vernachlässigenden Winkel  $\alpha$  rotiert.

Angenommen die Meridionalebene der beugenden Strukturfrequenz  $\vec{k}_m$  liegt o.B.d.A. in  $x$ -Richtung. Die optische Achse und damit die Ausbreitungsrichtung der einfallenden Welle liege in  $z$ -Richtung. Dann lautet die Matrix  $\hat{B}_\alpha$ , welche die dem Beugungswinkel entsprechende

Drehung vermittelt:

$$\hat{B}_\alpha = \begin{pmatrix} \cos(\alpha) & 0 & -\sin(\alpha) \\ 0 & 1 & 0 \\ \sin(\alpha) & 0 & \cos(\alpha) \end{pmatrix}. \quad (\text{K.1})$$

$\alpha$  ist der Beugungswinkel, der sich bei der Beugung einer monochromatischen Welle mit Wellenlänge  $\lambda$  an einer Struktur mit Periode  $p$  ergibt ( $n \sin(\alpha) = \lambda/p$ ). Das Produkt der Matrix  $\hat{B}_\alpha$  mit dem elektrischen Feldvektor  $\vec{E}_0$  der Welle vor der Beugung ergibt dann den Feldvektor nach der Beugung, falls die Struktur eine Frequenz in  $x$ -Richtung enthält. Falls die Richtung der Frequenz nicht die  $x$ -Richtung ist, bzw. falls der Winkel der Struktur relativ zur  $x$ -Richtung  $\theta$ , größer als null ist, wird das Koordinatensystem vor der Multiplikation mit der Matrix  $\hat{B}_\alpha$  um den Winkel  $-\theta$  in der  $x-y$ -Ebene rotiert; nach der Multiplikation mit  $\hat{B}_\alpha$  wird die Drehung wieder rückgängig gemacht. Insgesamt ergibt das

$$\vec{E}_\theta = \underbrace{\hat{R}_\theta \hat{B}_\alpha \hat{R}_{-\theta}}_{\hat{B}_{\alpha,\theta}} \vec{E}_0, \quad (\text{K.2})$$

wobei  $R_\theta$  folgendermaßen definiert ist:

$$\hat{R}_\theta := \begin{pmatrix} \cos(\theta) & -\sin(\theta) & 0 \\ \sin(\theta) & \cos(\theta) & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (\text{K.3})$$

Setzt man (K.1) und (K.3) in Gleichung (K.2) ein, so erhält man:

$$\hat{B}_{\alpha,\theta} = \begin{pmatrix} \cos^2(\theta) \cos(\alpha) + \sin^2(\theta) & \sin(\theta) \cos(\theta) (\cos(\alpha) - 1) & -\cos(\theta) \sin(\alpha) \\ \sin(\theta) \cos(\theta) (\cos(\alpha) - 1) & \sin^2(\theta) \cos(\alpha) + \cos^2(\theta) & -\sin(\theta) \sin(\alpha) \\ \cos(\theta) \sin(\alpha) & \sin(\theta) \sin(\alpha) & \cos(\alpha) \end{pmatrix} \quad (\text{K.4})$$

Mit Hilfe der Matrix  $\hat{B}_{\alpha,\theta}$  in Gleichung (K.4) kann der elektrische Feldvektor für die jeweiligen Beugungsordnungen des hexagonalen Musters berechnet werden. Der Winkel  $\theta_m$ , der der  $m$ -ten Beugungsordnung entspricht, kann Tabelle K.1 entnommen werden.

Für den Fall, dass die gebeugte Welle linear polarisiert ist, kann man den elektrischen Feldvektor vor der Beugung  $\vec{E}_0$  schreiben als

$$\vec{E}_0 = E_0 \begin{pmatrix} \cos(\chi) \\ \sin(\chi) \\ 0 \end{pmatrix}, \quad (\text{K.5})$$



$\vec{k}_m$	$\vec{k}_0 = \vec{0}$	$\vec{k}_{\pm 1} = \pm \frac{\pi}{p} \begin{pmatrix} 0 \\ 2 \end{pmatrix}$	$\vec{k}_{\pm 2} = \pm \frac{\pi}{p} \begin{pmatrix} \sqrt{3} \\ -1 \end{pmatrix}$	$\vec{k}_{\pm 3} = \pm \frac{\pi}{p} \begin{pmatrix} \sqrt{3} \\ 1 \end{pmatrix}$
$\theta_{+m}$	$0^\circ$	$90^\circ$	$-30^\circ$	$30^\circ$
$\theta_{-m}$		$-90^\circ$	$150^\circ$	$-150^\circ$

**Tabelle K.1.:** Tabelle der Winkel  $\theta_m$  für die Frequenzen  $\vec{k}_m$  des hexagonalen Musters.

wobei  $\chi$  den Winkel zwischen der Polarisationsrichtung und der  $x$ -Achse bezeichnet und  $E_0$  die Feldstärke. Der elektrische Feldvektor der  $m$ -ten Beugungsordnung ist dann gegeben durch

$$\vec{E}_m = \cos(\chi) \vec{E}_m^{(c)} + \sin(\chi) \vec{E}_m^{(s)} \quad , \quad (\text{K.6})$$

wobei  $\vec{E}_m^{(c)}$  und  $\vec{E}_m^{(s)}$  jeweils gegeben sind durch die erste und zweite Spalte der Matrix in Gleichung (K.4):

$$\vec{E}_m^{(c)} = E_0 \begin{pmatrix} \cos^2(\theta_m) \cos(\alpha) + \sin^2(\theta_m) \\ \sin(\theta_m) \cos(\theta_m) (\cos(\alpha) - 1) \\ \cos(\theta_m) \sin(\alpha) \end{pmatrix} \quad (\text{K.7})$$

$$\vec{E}_m^{(s)} = E_0 \begin{pmatrix} \sin(\theta_m) \cos(\theta_m) (\cos(\alpha) - 1) \\ \sin^2(\theta_m) \cos(\alpha) + \cos^2(\theta_m) \\ \sin(\theta_m) \sin(\alpha) \end{pmatrix} \quad (\text{K.8})$$

Konkret ergeben sich für die Vektoren  $\vec{E}_m^{(c)}$  und  $\vec{E}_m^{(s)}$ , die in Tabelle K.2 gezeigten Vektoren.

$\vec{E}_0^{(c)} = E_0 \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$	$\vec{E}_0^{(s)} = E_0 \begin{pmatrix} 0 \\ 1 \\ 0 \end{pmatrix}$
$\vec{E}_{\pm 1}^{(c)} = E_0 \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$	$\vec{E}_{\pm 1}^{(s)} = E_0 \begin{pmatrix} 0 \\ \cos(\alpha) \\ \pm \sin(\alpha) \end{pmatrix}$
$\vec{E}_{\pm 2}^{(c)} = E_0 \begin{pmatrix} \frac{1}{4}(1 + 3 \cos(\alpha)) \\ -\frac{1}{4} \sqrt{3} (\cos(\alpha) - 1) \\ \pm \frac{1}{2} \sqrt{3} \sin(\alpha) \end{pmatrix}$	$\vec{E}_{\pm 2}^{(s)} = E_0 \begin{pmatrix} -\frac{1}{4} \sqrt{3} (\cos(\alpha) - 1) \\ \frac{1}{4} (\cos(\alpha) + 3) \\ \mp \frac{1}{2} \sin(\alpha) \end{pmatrix}$
$\vec{E}_{\pm 3}^{(c)} = E_0 \begin{pmatrix} \frac{1}{4}(1 + 3 \cos(\alpha)) \\ \frac{1}{4} \sqrt{3} (\cos(\alpha) - 1) \\ \pm \frac{1}{2} \sqrt{3} \sin(\alpha) \end{pmatrix}$	$\vec{E}_{\pm 3}^{(s)} = E_0 \begin{pmatrix} \frac{1}{4} \sqrt{3} (\cos(\alpha) - 1) \\ \frac{1}{4} (\cos(\alpha) + 3) \\ \pm \frac{1}{2} \sin(\alpha) \end{pmatrix}$

**Tabelle K.2.:** Tabellarische Auflistung der Werte von  $\vec{E}_m^{(c)}$  und  $\vec{E}_m^{(s)}$  aus Gleichung (K.7) und (K.8) für die Frequenz-Ordnungen des hexagonalen Musters.

Wie bereits beschrieben ist der Winkel  $\alpha$  gegeben durch

$$\sin(\alpha) = \frac{\lambda}{np} = \frac{\lambda}{n} f_r = \frac{NA}{n} \nu, \quad (\text{K.9})$$

wobei  $f_r$  und  $\nu$  die in Abschnitt 2.4 definierten Frequenzen sind. Im Fall der strukturierten Beleuchtung wird üblicherweise  $\nu = 1$  als Frequenz gewählt.

## K.2. Berechnung der Musterintensität in der Probe

Es wird zunächst angenommen, dass die Beträge der Amplituden der interferierenden Beugungsordnungen alle den gleichen Betrag haben. Das sich so ergebende Feld, lässt sich folgendermaßen schreiben:

$$\begin{aligned} \vec{E}_\alpha = \vec{E}_0 &+ \vec{E}_{\alpha,1} e^{-i(\vec{k}_1 \cdot \vec{x} - \Phi_1)} + \vec{E}_{\alpha,2} e^{-i(\vec{k}_2 \cdot \vec{x} - \Phi_2)} + \vec{E}_{\alpha,3} e^{-i(\vec{k}_3 \cdot \vec{x} - \Phi_3)} \\ &+ \vec{E}_{\alpha,-1} e^{i(\vec{k}_1 \cdot \vec{x} - \Phi_1)} + \vec{E}_{\alpha,-2} e^{i(\vec{k}_2 \cdot \vec{x} - \Phi_2)} + \vec{E}_{\alpha,-3} e^{i(\vec{k}_3 \cdot \vec{x} - \Phi_3)}, \end{aligned} \quad (\text{K.10})$$

wobei  $\Phi_1$ ,  $\Phi_2$  und  $\Phi_3$  die den Weglängenunterschieden zwischen der 1., 2. und 3. und der 0. Beugungsordnung im Punkt  $\vec{x} = 0$  entsprechenden Phasendifferenzen sind. Sie hängen von der absoluten Lage des Musters bzw. der Wahl des Koordinatensystems ab. Daher wird im folgenden  $\Phi_1 = \Phi_2 = \Phi_3 = 0$  angenommen. Die entsprechende Musterintensität ergibt sich dann aus dem Absolutbetragsquadrat von Gleichung (K.10):

$$I_\alpha = |\vec{E}_\alpha|^2 = \left| \sum_{m=-3}^3 \vec{E}_m e^{i(\vec{k}_m \cdot \vec{x})} \right|^2 = \underbrace{\sum_{m=-3}^3 \sum_{n=-3}^3 \vec{E}_m \cdot \vec{E}_n e^{-i[(\vec{k}_m - \vec{k}_n) \cdot \vec{x}]} }_{49 \text{ Terme}} = \underbrace{\sum_{j=-9}^9 c_j e^{-i\vec{k}_j \cdot \vec{x}}}_{19 \text{ Terme}}, \quad (\text{K.11})$$

wobei die Koeffizienten  $c_j$  gegeben sind durch

$$c_j = \sum_{(m,n) \in \mathbb{A}_j} \vec{E}_m \cdot \vec{E}_n, \quad (\text{K.12})$$

und die Indexmenge  $\mathbb{A}_j$  gegeben ist durch  $\mathbb{A}_j = \{(m, n) \mid (\vec{k}_m - \vec{k}_n) = \vec{k}_j\}$ . Für die Modulationen  $m_j$  der Anregungsintensität gilt:

$$m_j = \frac{c_j}{c_0} \quad (\text{K.13})$$

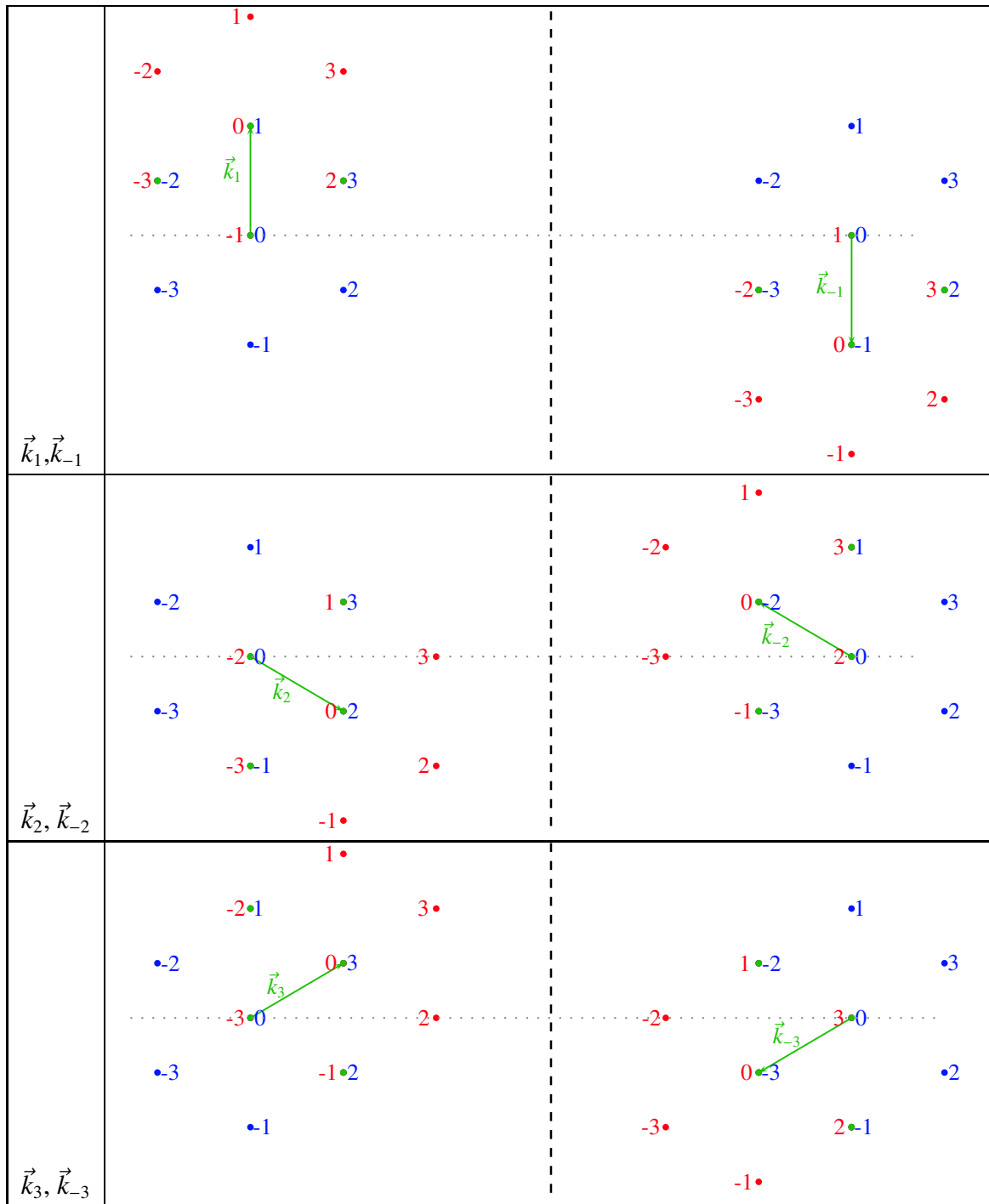
Aus den Gleichungen (K.10) und (K.11) sieht man, dass die Beträge der Amplituden in der Summe ganz rechts in Gleichung (K.11) durch die Skalarprodukte der interferierenden elektrischen Felder  $\vec{E}_m \cdot \vec{E}_n$  gegeben sind. Weiterhin sieht man, dass die in der Intensität enthaltenen Frequenzen durch die Differenzen der Amplitudenfrequenzen gegeben ist. Diese Tatsache ist äquivalent dazu, dass die Fourier-Transformierte der Intensität durch die Autokorrelation der Fourier-Transformierte der Amplitude gegeben ist, was aus dem Faltungstheorem (siehe Abschnitt A) folgt. Insgesamt ergeben sich auf der rechten Seite von Gleichung (K.11) 49 Terme, welche zu insgesamt 19 verschiedenen Frequenzordnungen in der Intensität führen (vgl. Abbildung I.1).

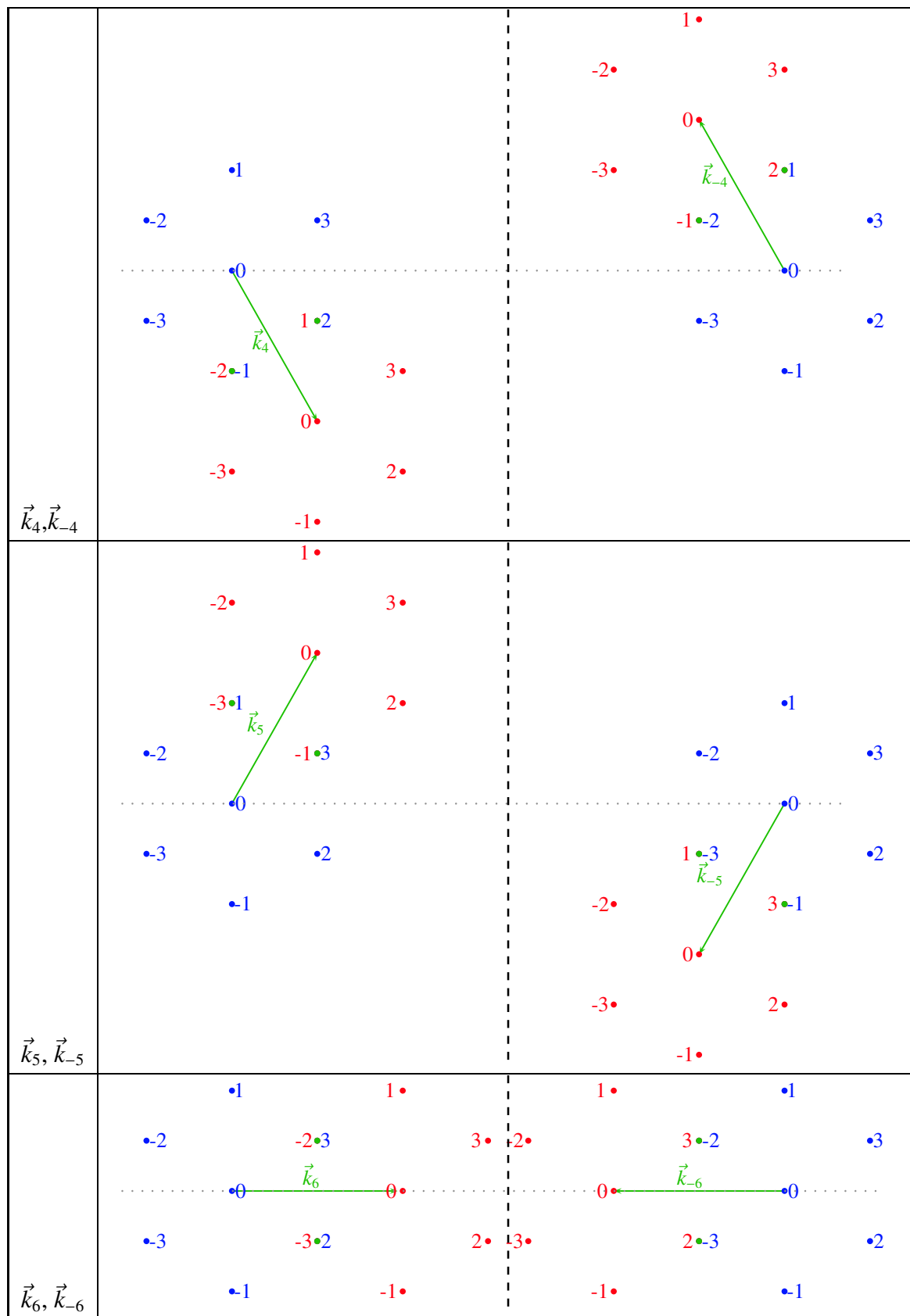
Die zu den Koeffizienten  $c_j$  gehörende Indexmenge  $\Lambda_j$  kann der Tabelle K.3 in folgendem Abschnitt entnommen werden.

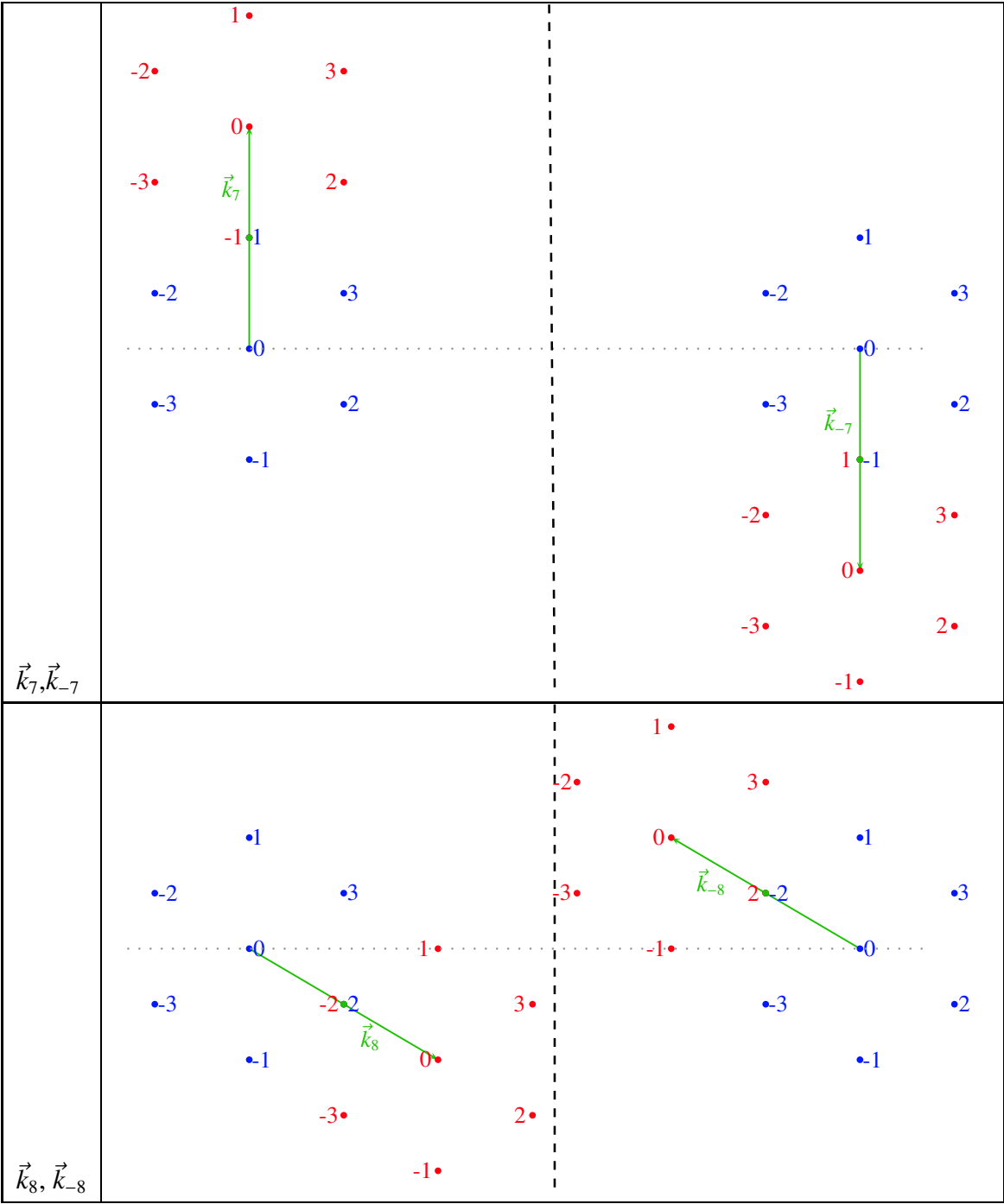
### K.3. Anteile des Intensitätsspektrums

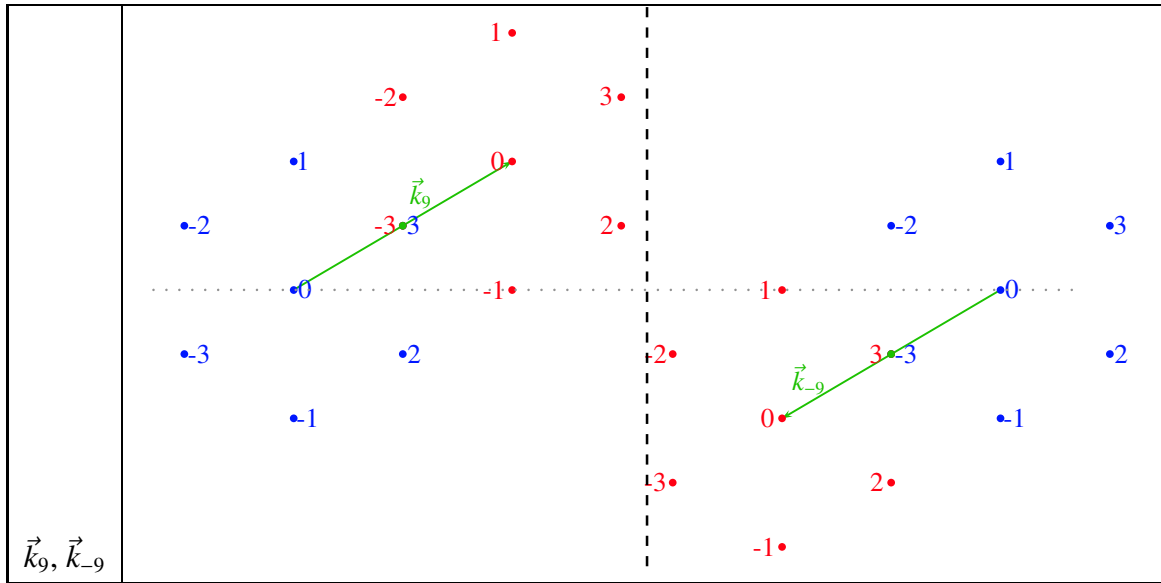
Die Frequenzanteile des Intensitätsspektrums des hexagonalen Phasenmusters ergeben sich aus der Interferenz der am Muster gebeugten Wellenanteile. In folgender Tabelle ist illustriert, welche Amplituden-Beugungsordnungen an der entsprechenden Intensitäts-Frequenzordnung enthalten sind. Bei Berücksichtigung von Polarisierungseffekten, können so die erwarteten Musterkontraste in der Probe für die  $m$ -te Frequenzordnung durch Bildung der Summe der Skalarprodukte der entsprechenden elektrischen Feldvektoren ermittelt werden. Die interferierenden Amplituden sind in rot und blau eingezeichnet. Der sich ergebende Frequenzvektor der Intensität ist (außer bei der null-Frequenz) grün eingezeichnet. Für die Terme der Grundfrequenz tragen jeweils 4, zu der Frequenz mit  $|\vec{k}| = \sqrt{3}\frac{\pi}{p}$  jeweils 2 Terme bei. Zu der doppelten Grundfrequenz ( $|\vec{k}| = 2\frac{2\pi}{p}$ ) trägt jeweils ein Term bei.

$\vec{k}_0$	









**Tabelle K.3.:** Anteile der Amplituden, die zu den Frequenzen  $\vec{k}_m$  der Intensität des hexagonalen Musters beitragen.

## K.4. Lineare Polarisation

Im Fall linearer Polarisation ist der elektrische Feldvektor für die  $m$ -te Beugungsordnung des hexagonalen Musters durch Gleichung (K.6) gegeben. Für die Koeffizienten in Gleichung (K.12) folgt daraus:

$$\begin{aligned}
 c_j(\alpha, \chi) = & \cos^2(\chi) \sum_{(m,n \in \mathbb{A}_j)} \vec{E}_m^{(c)} \cdot \vec{E}_n^{(c)} + \sin^2(\chi) \sum_{(m,n \in \mathbb{A}_j)} \vec{E}_m^{(s)} \cdot \vec{E}_n^{(s)} + \\
 & + \sin(\chi) \cos(\chi) \sum_{(m,n \in \mathbb{A}_j)} \left( \vec{E}_m^{(c)} \cdot \vec{E}_n^{(s)} + \vec{E}_m^{(s)} \cdot \vec{E}_n^{(c)} \right)
 \end{aligned} \quad (\text{K.14})$$

Insgesamt ergeben sich für die Koeffizienten  $c_j$  als Funktion des Polarisationswinkels  $\chi$  und des Beugungswinkels  $\alpha$ , die in Tabelle K.4 aufgeführten Ausdrücke.

$j$	$c_j(\alpha, \chi)/E_0^2$
0	7
1	$\frac{1}{8}[\cos^2(\chi)(23 + 12 \cos(\alpha) - 3 \cos(2\alpha)) + \sin^2(\chi)(3 + 28 \cos(\alpha) + \cos(2\alpha))]$
2	$\frac{1}{4} \left[ 4 \cos^2(\chi)(1 + 3 \cos(\alpha)) + \sin^2(\chi)(9 + 8 \cos(\alpha) - \cos(2\alpha)) + \sin(\chi) \cos(\chi)(4 \sqrt{3}(3 + \cos(\alpha)) \sin^2(\frac{\alpha}{2})) \right]$

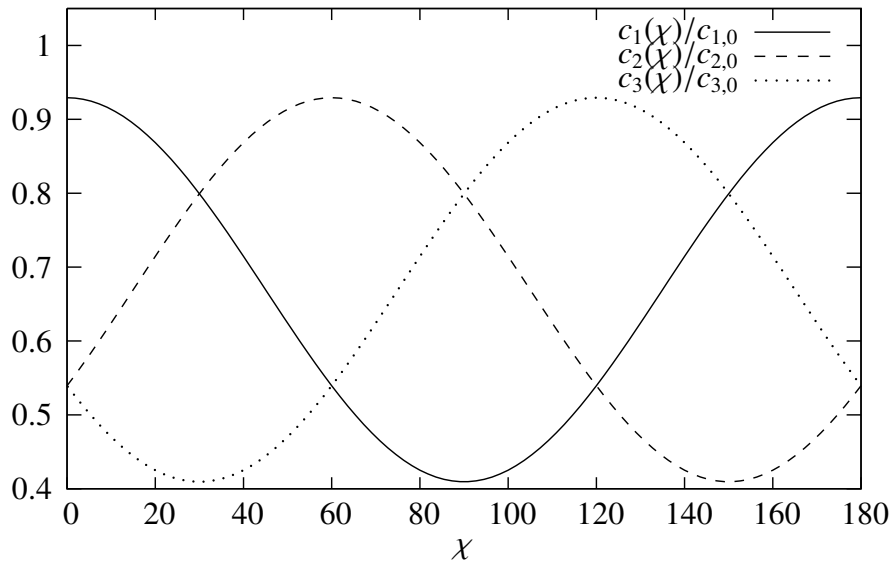
3	$\frac{1}{4}$	$4 \cos^2(\chi)(1 + 3 \cos(\alpha)) + \sin^2(\chi)(9 + 8 \cos(\alpha) - \cos(2\alpha)) - \sin(\chi) \cos(\chi)(4 \sqrt{3}(3 + \cos(\alpha)) \sin^2(\frac{\alpha}{2}))$	
4	$\frac{1}{4}$	$\cos^2(\chi)(2 + 6 \cos(\alpha)) + \sin^2(\chi)(-1 + 6 \cos(\alpha) + 3 \cos(2\alpha)) + \sin(\chi) \cos(\chi)6 \sqrt{3} \sin^2(\alpha)$	
5	$\frac{1}{4}$	$\cos^2(\chi)(2 + 6 \cos(\alpha)) + \sin^2(\chi)(-1 + 6 \cos(\alpha) + 3 \cos(2\alpha)) - \sin(\chi) \cos(\chi)6 \sqrt{3} \sin^2(\alpha)$	
6	$\frac{1}{8}$	$\cos^2(\chi)(-5 + 12 \cos(\alpha) + 9 \cos(2\alpha)) + \sin^2(\chi)(7 + 12 \cos(\alpha) - 3 \cos(2\alpha))$	
7		$\cos^2(\chi) + \sin^2(\chi) \cos(2\alpha)$	
8	$\frac{1}{4}$	$\cos^2(\chi)(1 + 3 \cos(2\alpha)) + \sin^2(\chi)(3 + \cos(2\alpha)) + \sin(\chi) \cos(\chi)4 \sqrt{3} \sin^2(\alpha)$	
9	$\frac{1}{4}$	$\cos^2(\chi)(1 + 3 \cos(2\alpha)) + \sin^2(\chi)(3 + \cos(2\alpha)) - \sin(\chi) \cos(\chi)4 \sqrt{3} \sin^2(\alpha)$	

**Tabelle K.4.:** Die nach Gleichung (K.14) berechneten Koeffizienten  $c_j$  bei linearer Polarisation als Funktion des Polarisationswinkels  $\chi$  und des Beugungswinkels  $\alpha$ .

Um eine Vorstellung für die Terme in Tabelle K.4 zu bekommen, folgt eine exemplarische grafische Darstellung der Terme als Funktion des Polarisationswinkels  $\chi$ . Die Koeffizienten  $c_j$  wurden jeweils mit den Werten  $c_{j0}$  normiert, die man ohne Berücksichtigung der Polarisation erhalten hätte. In dem Beispiel in den Abbildungen K.1, K.2 und K.3 wurde von Ölimmersi-on mit einem Brechungsindex von  $n \approx 1,518$ , einer numerischen Apertur von  $NA = 1,4$  und einer normalisierten Gitterfrequenz von  $\nu = 1$  ausgegangen, was nach Gleichung (K.9) einem Beugungswinkel  $\alpha \approx 67,3^\circ$  entspricht.

Man sieht, dass die Intensitätskontraste der Frequenzen bei linearer Polarisation stark variieren. Eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Kontraste über die Intensitätsfrequenzen erreicht man gemäß Abbildung K.1, K.2 und K.3, wenn man für den Polarisationswinkel  $(30^\circ + n60^\circ | n \in \mathbb{Z})$  wählt, d.h. die Polarisation in Richtung einer der drei Grundfrequenzen  $\vec{k}_1$ ,  $\vec{k}_2$  oder  $\vec{k}_3$  legt. Wählt man o.B.d.A. beispielsweise  $\chi = 90^\circ$ , also die Richtung von  $\vec{k}_1$ , so erreicht man für die Koeffizienten  $c_j/c_{j0}$  die in Tabelle K.5 aufgeführten Werte. Die negativen Werte der Koeffizienten  $c_j$  entsprechen einer Invertierung der entsprechenden Frequenz, bzw. einer Phasenverschiebung um  $\pi$ .





**Abb. K.1.:** Grafische Darstellung der Koeffizienten  $c_j$  aus Tabelle K.4 für  $j \in \{1, 2, 3\}$  als Funktion von  $\chi$ . In dem Beispiel wurde von einem Beugungswinkel von  $\alpha \approx 67,3^\circ$  ausgegangen, was einer NA von 1,4, einem Brechungsindex von  $n \approx 1,518$  und einer normalisierten Gitterfrequenz von  $\nu = 1$  entspricht. Die Normierungsfaktoren  $c_{1,0}$ ,  $c_{2,0}$  und  $c_{3,0}$  entsprechen den Koeffizienten, die man ohne Berücksichtigung der Polarisation erhalten hätte und es gilt  $c_{1,0} = c_{2,0} = c_{3,0} = 4$ .

$j$	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$c_j/c_{j,0}[\%]$	41,0	79,8	79,8	-10	-10	85	-70	57	57

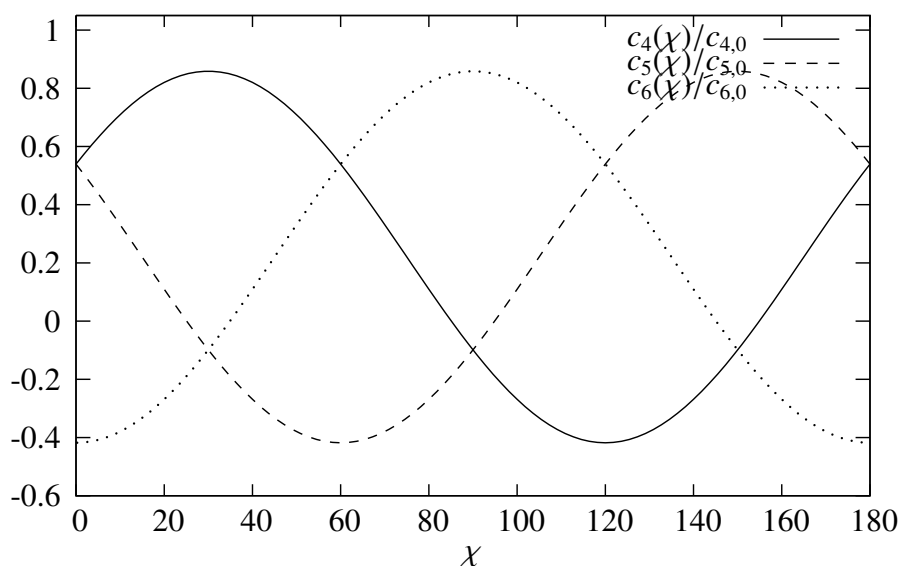
**Tabelle K.5.:** Tabelle der Koeffizienten  $c_j/c_{j,0}$  für lineare Polarisation und  $\chi = 90^\circ$ .

## K.5. Z-Abhängigkeit der Koeffizienten $c_j$

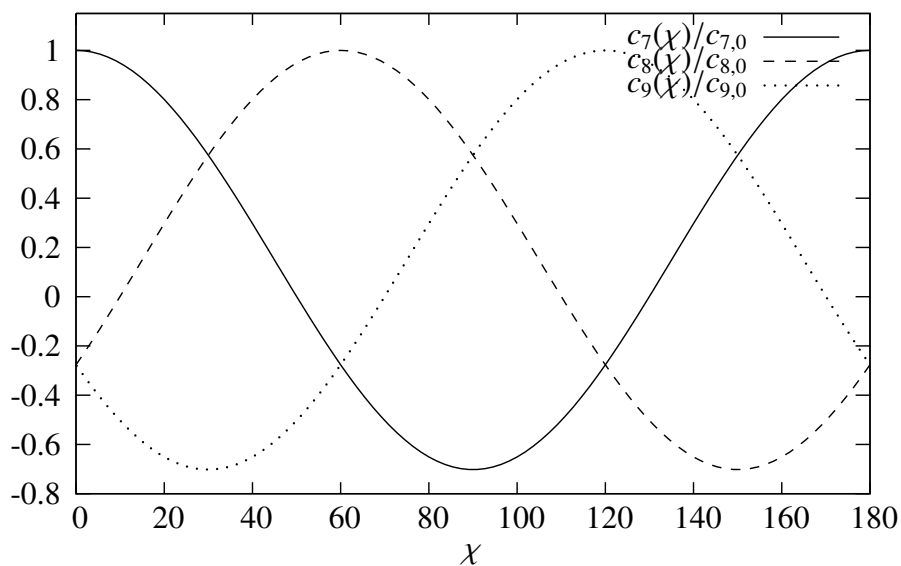
Wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben, sind nur die Modulationen erster Ordnung (d.h. diejenigen Modulationen der Grundfrequenz) von  $z$  abhängig. Diese  $z$ -Abhängigkeit kommt durch die Interferenz der 0. Beugungsordnung des Musters mit den jeweils ersten Beugungsordnungen zustande (siehe Abbildung 3.13). Die Intensitäten erster Ordnung kommen beim Hexagon allerdings nicht nur durch die Interferenz zwischen der 0. und den ersten Beugungsordnungen zustande, sondern auch durch Interferenz unter den ersten Beugungsordnungen, wie in Tabelle K.3 gezeigt.

D.h. die Koeffizienten  $c_1(\chi)$ ,  $c_2(\chi)$  und  $c_3(\chi)$  können in einen von der  $z$ -Koordinate abhängigen ( $c_j^{(z)}(\chi)$ ) und einen  $z$ -unabhängigen Anteil ( $c_j^{(0)}(\chi)$ ) zerlegt werden:

$$c_j(\chi) = c_j^{(z)}(\chi) + c_j^{(0)}(\chi) \quad j \in \{1, 2, 3\}$$



**Abb. K.2.:** Grafische Darstellung der Koeffizienten  $c_j$  aus Tabelle K.4 für  $j \in \{4, 5, 6\}$  als Funktion von  $\chi$  entsprechend dem Beispiel in Abbildung K.1. Für die Normierungsfaktoren  $c_{4,0}$ ,  $c_{5,0}$  und  $c_{6,0}$  gilt  $c_{4,0} = c_{5,0} = c_{6,0} = 2$ .



**Abb. K.3.:** Grafische Darstellung der Koeffizienten  $c_j$  aus Tabelle K.4 für  $j \in \{7, 8, 9\}$  als Funktion von  $\chi$  entsprechend dem Beispiel in Abbildung K.1. Für die Normierungsfaktoren  $c_{7,0}$ ,  $c_{8,0}$  und  $c_{9,0}$  gilt  $c_{7,0} = c_{8,0} = c_{9,0} = 1$ .

Gemäß Gleichung (K.13) gilt diese Zerlegung analog für die Modulationen  $m_j$  der Anregungsintensität:

$$m_j(\chi) = m_j^{(z)}(\chi) + m_j^{(0)}(\chi) \quad j \in \{1, 2, 3\} \quad (\text{K.15})$$

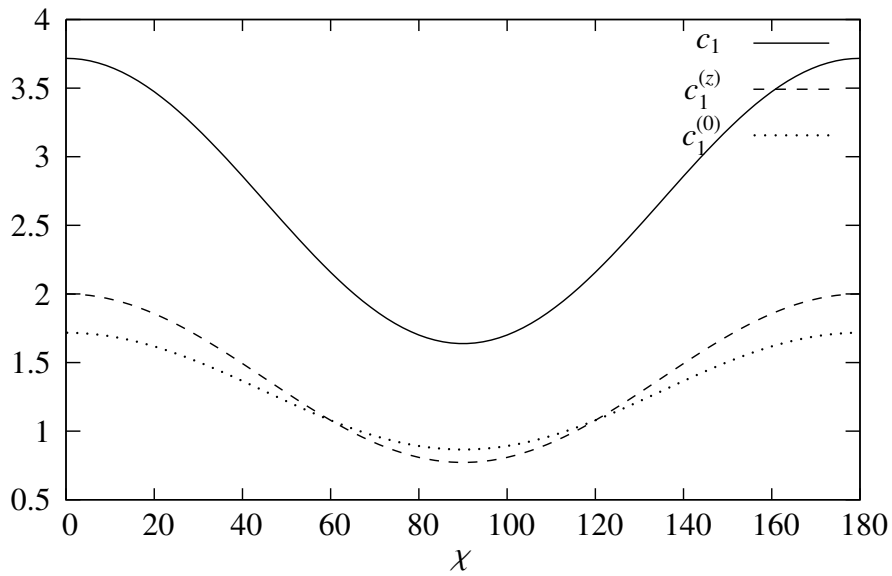
Entsprechend den Koeffizienten  $c_j(\chi)$  in Tabelle K.4 sind die Koeffizienten  $c_j^{(z)}(\chi)$  und  $c_j^{(0)}(\chi)$  als Funktion des Beugungswinkels  $\alpha$  und des Polarisationswinkels  $\chi$  in Tabelle K.6 aufgeführt und für  $\alpha \approx 67,3^\circ$  exemplarisch in den Abbildungen K.4 - K.6 grafisch dargestellt. Tabelle K.7 gibt für diesen Beugungswinkel  $\alpha$  einen Überblick über die Koeffizienten, falls man für die Polarisationsrichtung  $\chi = 90^\circ$  wählt. Insgesamt sieht man, dass die Abweichungen zwischen den  $z$ -abhängigen und  $z$ -unabhängigen Koeffizienten unabhängig vom Beugungswinkel klein ist.

$j$	$c_j^{(z)}(\alpha, \chi)/E_0^2$	$c_j^{(0)}(\alpha, \chi)/E_0^2$
1	$2 \cos^2(\chi) + 2 \cos(\alpha) \sin^2(\chi)$	$\frac{1}{8} \left[ \cos^2(\chi)(7 + 12 \cos(\alpha) - 3 \cos(2\alpha)) + \sin^2(\chi)(3 + 12 \cos(\alpha) + \cos(2\alpha)) \right]$
2	$\cos^2(\chi) \left[ \frac{1}{2} + \frac{3}{2} \cos(\alpha) \right] + \sin^2(\chi) \left[ \frac{3}{2} + \frac{1}{2} \cos(\alpha) \right] + \sin(\chi) \cos(\chi) \left[ \sqrt{3}(1 - \cos(\alpha)) \right]$	$\cos^2(\chi) \left[ \frac{1}{2} + \frac{3}{2} \cos(\alpha) \right] + \sin^2(\chi) \left[ \frac{3}{4} + \frac{3}{2} \cos(\alpha) - \frac{1}{4} \cos(2\alpha) \right] + \sin(\chi) \cos(\chi) \left[ \frac{1}{2} \sqrt{3} \sin^2(\alpha) \right]$
3	$\cos^2(\chi) \left[ \frac{1}{2} + \frac{3}{2} \cos(\alpha) \right] + \sin^2(\chi) \left[ \frac{3}{2} + \frac{1}{2} \cos(\alpha) \right] - \sin(\chi) \cos(\chi) \left[ \sqrt{3}(1 - \cos(\alpha)) \right]$	$\cos^2(\chi) \left[ \frac{1}{2} + \frac{3}{2} \cos(\alpha) \right] + \sin^2(\chi) \left[ \frac{3}{4} + \frac{3}{2} \cos(\alpha) - \frac{1}{4} \cos(2\alpha) \right] - \sin(\chi) \cos(\chi) \left[ \frac{1}{2} \sqrt{3} \sin^2(\alpha) \right]$

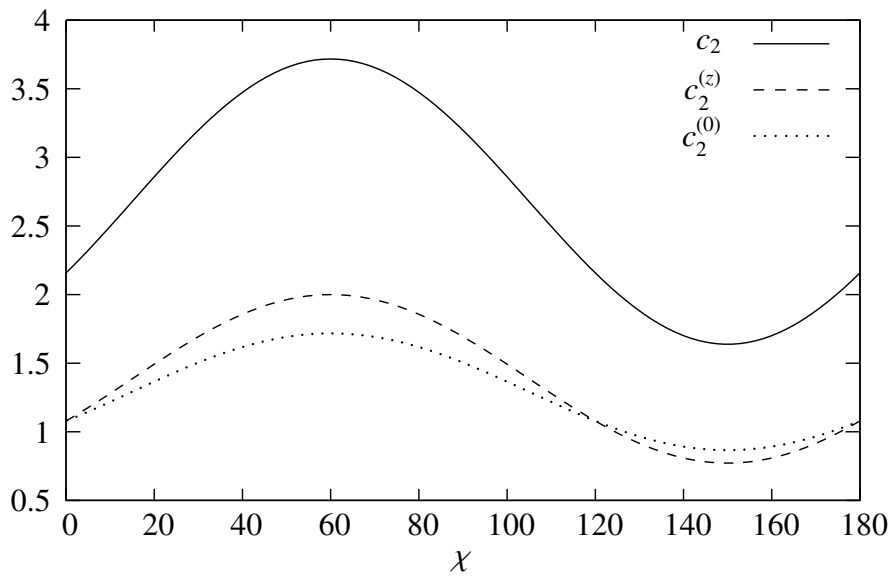
**Tabelle K.6.:** Die Zerlegung der Koeffizienten  $c_j(\chi)|j \in \{1, 2, 3\}$  in einen von  $z$  abhängigen und einen von  $z$  unabhängigen Anteil. Es gilt  $c_j(\chi) = c_j^{(z)}(\chi) + c_j^{(0)}(\chi) \forall j \in \{1, 2, 3\}$ . Die aufgeführten Koeffizienten sind in Abbildung K.4 - K.6 für  $\alpha \approx 67,3^\circ$  als Funktion von  $\chi$  gezeigt.

j	1	2	3
$c_j/c_{j,0}[\%]$	41,0	79,8	79,8
$c_j^{(z)}/c_{j,0}[\%]$	19,3	42,3	42,3
$c_j^{(0)}/c_{j,0}[\%]$	21,8	37,5	37,5

**Tabelle K.7.:** Tabelle der Koeffizienten  $c_j/c_{j,0}$ ,  $c_j^{(z)}/c_{j,0}$  und  $c_j^{(0)}/c_{j,0}$  ( $j \in \{1, 2, 3\}$ ) für lineare Polarisation mit  $\chi = 90^\circ$ .



**Abb. K.4.:** Grafische Darstellung der Koeffizienten  $c_1(\chi)$ ,  $c_1^{(z)}(\chi)$  und  $c_1^{(0)}(\chi)$



**Abb. K.5.:** Grafische Darstellung der Koeffizienten  $c_2(\chi)$ ,  $c_2^{(z)}(\chi)$  und  $c_2^{(0)}(\chi)$

## K.6. Zirkulare Polarisation

Ausgehend von den Koeffizienten in Tabelle K.4 für lineare Polarisation, können die entsprechenden Koeffizienten für zirkulare Polarisation leicht ermittelt werden. Nimmt man wie in dem Beispiel in Abschnitt K.4 eine numerische Apertur von  $NA=1,4$ , einen Brechungsindex des Immersionsmediums von  $n \approx 1,518$  und eine normalisierte Gitterfrequenz von  $\nu = 1$ ,

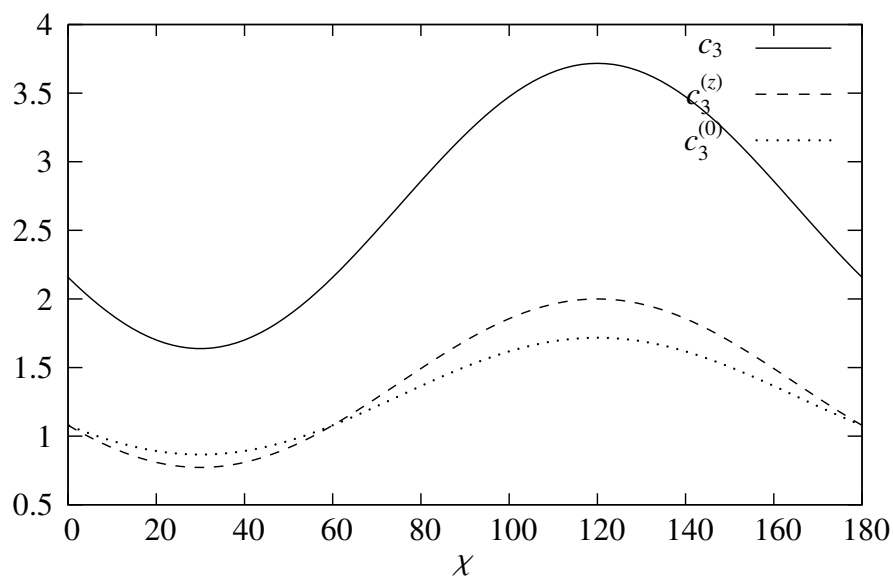


Abb. K.6.: Grafische Darstellung der Koeffizienten  $c_3(\chi)$ ,  $c_3^{(z)}(\chi)$  und  $c_3^{(0)}(\chi)$

$j$	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$c_j/c_{j,0}[\%]$	66,9	66,9	66,9	22,1	22,1	22,1	14,9	14,9	14,9

Tabelle K.8.: Tabelle der Koeffizienten  $c_j/c_{j,0}$  für zirkulare Polarisation.

sowie die selbe Amplitude  $E_0$  für alle hexagonalen Beugungsordnungen an, so erhält man die in Tabelle K.8 aufgeführten Werte für die Koeffizienten  $c_j/c_{j,0}$ .



# Abbildungsverzeichnis

1.1. Vergleich zwischen einer Epifluoreszenzmikroskopie Aufnahme und einer quasikonfokalen Aufnahme (SIM). . . . .	2
2.1. Skizze zur Beugungstheorie von Helmholtz und Kirchhoff . . . . .	10
2.2. Beispiel zur Fraunhoferschen Beugung. . . . .	11
2.3. Grafische Darstellung der Funktion $ 2 \frac{J_1(x)}{x} ^2$ . . . . .	12
2.4. Skizze zur Interferenz von Lichtwellen. . . . .	14
2.5. Skizze zur inkohärenten Abbildung in einem Mikroskop. . . . .	15
2.6. Gesamtintensität bei inkohärenter Überlagerung zweier Airy-Beugungsmuster. . . . .	16
2.7. Skizze der Bildentstehung nach Abbe. . . . .	17
2.9. Optische Transferfunktion eines fehlerfreien, beugungsbegrenzten optischen Systems. . . . .	25
2.10. Beispiel für die defokussierte OTF $O(\nu, z)$ für 10x NA 0,25 Luftimmersion. . . . .	29
(a). für verschiedene Defokussierungen $z$ in $\mu\text{m}$ gemäß Gleichung (2.39) . . . . .	29
(b). Halbwertsbreiten der OTF (a) in $\delta z$ -Richtung. . . . .	29
2.11. Beispiel für die defokussierte OTF $O(\nu, z)$ für 60x NA 1,45 Ölimmersion. . . . .	30
(a). für verschiedene Defokussierungen $z$ . . . . .	30
(b). Halbwertsbreiten der OTF (a) in $\delta z$ -Richtung. . . . .	30
2.12. Skizze zum Einfluss der Polarisierung bei der kohärenten Bildentstehung eines Gitters. . . . .	32
2.13. Grafische Darstellung der Koeffizienten der Fourier-Darstellung der Musterintensität aus Gleichungen (2.49) und (2.50). . . . .	35
2.14. 3D Darstellung der OTF (Gleichung (2.39)), wie sie auch in Abbildung (2.11) gezeigt ist. Die minimale Halbwertsbreite der OTF in $z$ -Richtung liegt bei $\nu = 1$ . . . . .	36
2.15. Darstellungen des Trägers der 3d-OTF. . . . .	36
3.1. Schematische Skizze zum Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops. . . . .	39

3.3. Auswirkung der Ausserfokus-Fluoreszenz auf den Bildkontrast und Tiefenschärfe . . . . .	41
3.4. Schematische Skizze des Prinzips der konfokalen Bildentstehung. . . . .	42
3.5. Schema eines Mikroskops mit Strukturierter Beleuchtung . . . . .	46
3.6. Vergleich der Konfokalitätsfunktionen $\mathcal{K}(z)$ eines Laserscanningmikroskops und eines SIM-Mikroskops. . . . .	49
3.7. Transmission $T(x)$ eines Rechtecksgitters. . . . .	49
3.8. Signalverlauf auf einem Pixel, abhängig von der aktuellen (Phasen-) Lage des Beleuchtungsgitterbildes. Die roten Punkte entsprechen 20 Werten für das Pixel $(x,y)$ aus 20 genommenen Phasenbildern. . . . .	51
3.9. Moiré-Effekt durch Überlagerung (Produkt) zweier Linienmuster. . . . .	54
3.10. Auflösungssteigerung durch den Moiré-Effekt (aus [Hei06a]). . . . .	55
3.11. Schematische Darstellung der Rekonstruktion eines Bildes mit gesteigerter Auflösung. . . . .	58
3.12. Effektive OTF der Rekonstruktion bei linearer gewichteter Überlagerung der Frequenzbänder $\tilde{D}_1^{(n)}$ für eine Orientierung $d = 1$ . . . . .	61
3.13. Illustration der in der Anregungsintensität enthaltenen Frequenzordnungen . .	64
4.1. Ein Schachbrettmuster als Faltung eines rein periodischen Musters mit einer zweidimensionalen Rechtecksfunktion als Grundmuster . . . . .	72
4.2. Geometrie der betrachteten Frequenzvektoren im benutzten Koordinatensystem	75
4.3. Das hexagonale Muster, wie es in Gleichung (4.26) definiert ist. . . . .	78
4.4. Berechnete MTFs für das quasikonfokale SIM Bildsignal . . . . .	83
(a). mit Liniengitter . . . . .	83
(b). mit Schachbrettmuster . . . . .	83
(c). mit Hexagonmuster . . . . .	83
4.5. Die Frequenzen des hexagonalen Musters in drei Dimensionen. . . . .	85
4.6. Vergleich der Varianzen der SR-SIM mit hexagonalen Mustern und Linien-gittern. . . . .	95
4.7. Kontraste der integrierten Anregungsintensität als Funktion der Linienbreite. .	99
4.8. Hexagonale Frequenzordnungen im linienkonfokalen Mikroskop. . . . .	101
4.9. Die hexagonale Anregungslinie. . . . .	102
4.10. Konfokalität bei hexagonaler linienkonfokaler SIM. . . . .	103
(a). Anregungskontraste für XL-SIM und SIM als Funktion von $z$ . . . . .	103
(b). Konfokalitätsfunktion für XL-SIM und SIM. . . . .	103



5.1. Vergleich zwischen einem einzelnen Phasenbild und einem quasikonfokalem Bild . . . . .	106
(a). Eines von insgesamt 5 gemessenen Rohbildern. . . . .	106
(b). Quasikonfokales SIM Bild . . . . .	106
5.2. Quasikonfokale hexagonale SIM . . . . .	108
(a). Eines von insgesamt 7 Phasenbildern . . . . .	108
(b). Quasikonfokales SIM Bild . . . . .	108
5.3. Vergleich der quasikonfokalen Bilder und der Absolutbeträge ihrer Fourier-transformierten . . . . .	109
(a). für Liniengitter SIM . . . . .	109
(b). für Hexagonmuster SIM . . . . .	109
5.4. SIP-Chart für SIM mit hexagonalem Muster . . . . .	110
5.5. Die Funktion $\eta(z)$ für den Bildstapel aus Abbildung 5.4. . . . .	111
6.1. Schematischer Aufbau des Anregungs- und Emissionsstrahlenganges. . . . .	114
6.2. 3D CAD Modell des verwendeten Mikroskop-Prototyps. . . . .	115
6.3. Qualitativer Vergleich zwischen hexagonaler Superresolution und Weitfeld. . . . .	118
6.4. Vergrößerte Darstellung der in Abbildung 6.3 markierten Bereiche und Vergleich zweier Intensitätsprofile. . . . .	119
(a). Oben: der mit „1“ markierte Bereich. Unten: der mit „2“ markierte Bereich. . . . .	119
(b). Intensitätsprofil entlang der weißen horizontalen Linie in (a) . . . . .	119
6.5. Bild der Nanoruler Probe. . . . .	121
6.7. Vergleich zwischen linienkonfokaler Mikroskopie und XL-SIM mit 50nm Beads	123
(a). Linienkonfokales mikroskopisches Bild . . . . .	123
(b). Bild mit linienkonfokaler hexagonaler SIM . . . . .	123
6.8. Vergrößerte Darstellung des markierten Bereiches in Abbildung 6.7 . . . . .	124
6.9. Grafische Darstellung der ermittelten Halbwertsbreiten in $(x/y)$ und $z$ . . . . .	125
6.10. Gemittelte linienkonfokale PSF für die Messung aus Abschnitt 6.2.2 . . . . .	127
6.11. Gemittelte linienkonfokale hexagonale SIM PSF für die Messung aus Abschnitt 6.2.2 . . . . .	128
6.12. Vergleich zwischen einem XL-SIM und einem LC Bild mit einem Schnitt aus einer Mäuseniere . . . . .	130
6.13. Dreidimensionale Darstellungen des Volumens aus Abbildung 6.12 . . . . .	131
6.14. Vergleich mit dem OMX Mikroskop . . . . .	133

6.15. Gesamtes Bildfeld der OMX-Messung . . . . .	134
B.1. Vergleich der Konfokalität eines CLSM und eines SIM-Mikroskops mit der in Gleichung (3.5) definierten Funktion $\eta(z)$ . . . . .	148
C.1. Grafische Darstellung zur Herleitung der PSF des Laserscanningmikroskops. . . . .	150
E.1. Die Varianzen der ausgewerteten Größen $I^{(n)}$ normiert auf die Varianz der gemessenen Größen $i_m$ . . . . .	165
H.1. Skizze zur kohärenten Bildentstehung eines Schachbrettmusters. . . . .	176
H.2. Der Verschiebevektor $N \cdot \vec{\Delta}$ beim Schachbrettmuster als Funktion des Parame- ters $\kappa$ . . . . .	177
I.1. Die Frequenzen des hexagonalen Musters bis $N = 19$ . . . . .	180
I.2. Die Verschiebevektoren $\vec{\Delta}$ bei hexagonaler SIM als Funktion des Parameters $\kappa$ . . . . .	183
J.1. Phasenmodulation durch ein Phasenmuster . . . . .	187
J.2. Skizze zum hexagonalen Phasenmuster . . . . .	189
J.3. Die Intensitäten der nullten und ersten Beugungsordnungen des hexagonalen Phasenmusters in der Pupillenebene des Mikroskopobjektivs. . . . .	192
J.4. Verlauf der komplexen Argumente von $c_0$ und $c_{\pm 1}$ . . . . .	194
K.1. Grafische Darstellung der Koeffizienten $c_j$ aus Tabelle K.4 für $j \in \{1, 2, 3\}$ . . . . .	207
K.2. Grafische Darstellung der Koeffizienten $c_j$ aus Tabelle K.4 für $j \in \{4, 5, 6\}$ . . . . .	208
K.3. Grafische Darstellung der Koeffizienten $c_j$ aus Tabelle K.4 für $j \in \{7, 8, 9\}$ . . . . .	208
K.4. Grafische Darstellung der Koeffizienten $c_1(\chi)$ , $c_1^{(z)}(\chi)$ und $c_1^{(0)}(\chi)$ . . . . .	210
K.5. Grafische Darstellung der Koeffizienten $c_2(\chi)$ , $c_2^{(z)}(\chi)$ und $c_2^{(0)}(\chi)$ . . . . .	210
K.6. Grafische Darstellung der Koeffizienten $c_3(\chi)$ , $c_3^{(z)}(\chi)$ und $c_3^{(0)}(\chi)$ . . . . .	211

# Tabellenverzeichnis

I.1.	Zusammenfassung aller Verschiebewinkel $\theta$ für das hexagonale Muster. . . .	182
I.2.	Zusammenfassung aller bis $N = 127$ vorkommenden Frequenzvektoren des hexagonalen Musters in aufsteigender Reihenfolge nach den Beträgen $ \vec{k}_{m,n}  = \frac{\pi}{p} \sqrt{3m^2 + n^2}$ sortiert. . . . .	183
K.1.	Tabelle der Winkel $\theta_m$ für die Frequenzen $\vec{k}_m$ des hexagonalen Musters. . . .	199
K.2.	Tabellarische Auflistung der Werte von $\vec{E}_m^{(c)}$ und $\vec{E}_m^{(s)}$ aus Gleichung (K.7) und (K.8) für die Frequenz-Ordnungen des hexagonalen Musters. . . . .	200
K.3.	Anteile der Amplituden, die zu den Frequenzen $\vec{k}_m$ der Intensität des hexagonalen Musters beitragen. . . . .	205
K.4.	Die nach Gleichung (K.14) berechneten Koeffizienten $c_j$ bei linearer Polarisation. . . . .	206
K.5.	Tabelle der Koeffizienten $c_j/c_{j,0}$ für lineare Polarisation und $\chi = 90^\circ$ . . . . .	207
K.6.	Die Zerlegung der Koeffizienten $c_j(\chi) j \in \{1, 2, 3\}$ in einen von $z$ abhängigen und einen von $z$ unabhängigen Anteil. . . . .	209
K.7.	Tabelle der Koeffizienten $c_j/c_{j,0}$ , $c_j^{(z)}/c_{j,0}$ und $a^{(0)}/c_{j,0}$ ( $j \in \{1, 2, 3\}$ ) für lineare Polarisation mit $\chi = 90^\circ$ . . . . .	209
K.8.	Tabelle der Koeffizienten $c_j/c_{j,0}$ für zirkuläre Polarisation. . . . .	211



# Literaturverzeichnis

- [Aga89] D. A. AGARD, Y. HIRAOKA, P. SHAW, J. W. SEDAT. *Fluorescence microscopy in three dimensions*. Methods Cell Biol. 30:353–377, 1989.
- [Bae70] S. C. BAER. *Optical apparatus providing focalplane-specific illumination - US patent 3547512*, 1970.
- [Bes11] G. BEST, R. AMBERGER, D. BADDELEY, T. ACH, S. DITHMAR, ET AL. *Structured illumination microscopy of autofluorescent aggregations in human tissue*. Micron , 2011.
- [Bet06] E. BETZIG, G. H. PATTERSON, R. SOUGRAT, O. W. LINDWASSER, S. OLENYCH, ET AL. *Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution*. Science 313(September):1642–1645, 2006.
- [Bor99] M. BORN, E. WOLF. *Principles of Optics*. Cambridge University Press, 1999.
- [Bra04] G. J. BRAKENHOFF, G. W. H. WURPEL, K. JALINK, L. OOMEN, L. BROCKS, ET AL. *Characterization of sectioning fluorescence microscopy with thin uniform fluorescent layers: Sectioned Imaging Property or SIPcharts..* Journal of Microscopy 219(Pt 3):122–32, September 2004.  
URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16176252>
- [Bro03] *Brockhaus Universal Lexikon von A-Z in 26 Bänden: Bd. 15. MEF-NAR..* F.A. Brockhaus GmbH, 2003.
- [Bui13] K. H. BUI, E. A. LEMKE, M. BECK. *Fourier ring correlation as a resolution criterion for super-resolution microscopy*. Journal of Structural Biology 183:363–367, 2013.
- [But15] M. BUTZLAFF, A. WEIGEL, E. PONIMASKIN, A. ZEUG. *ESIP: A novel solution-based sectioned image property approach for microscope calibration*. PLoS ONE 10(8),

2015.

- [Car95] W. CARRINGTON, R. LYNCH, E. MOORE, G. ISENBERG, K. E. FOGARTY, ET AL. *Super-resolution three-dimensional images of fluorescence in cells with minimal light exposure*. *Scienc* 268(June):1483–1487, 1995.
- [Cha09] B.-J. CHANG, L.-J. CHOU, Y.-C. CHANG, S.-Y. CHIANG. *Isotropic image in structured illumination microscopy patterned with a spatial light modulator*. *Opt. Express* , 2009.
- [Cha16] N. CHAKROVA, B. RIEGER, S. STALLINGA. *Deconvolution methods for structured illumination microscopy*. *Journal of the Optical Society of America* 33(7):12–20, 2016.
- [Che85] R. F. CHEN, C. H. SCOTT. *Atlas of fluorescence spectra and lifetimes of dyes attached to protein*, 1985.
- [Cla79] N. S. CLAXTON, T. J. FELLERS, M. W. DAVIDSON. *Laser Scanning Confocal Microscopy*. *Microscopy* , 1979.
- [Con05] J.-A. CONCHELLO, J. W. LICHTMAN. *Optical sectioning microscopy*. *Nature Methods* 2(12):920–931, Dezember 2005.
- [Cra00] G. E. CRAGG, P. T. C. SO. *Lateral resolution enhancement with standing evanescent waves*. *Optics Letters* 25(1):46–48, 2000.
- [Cub95] A. CUBITT, R. HEIM, S. ADAMS, A. BOYD, L. GROSS, ET AL. *Understanding, improving and using green fluorescent proteins*. *Trends Biochem Sci* , 1995.
- [De1] DELTAVISION. *DeltaVision|OMX™ 3D-SIM Super-Resolution Imaging™* .
- [Den90] W. DENK, J. H. STRICKLER, W. W. WEBB. *Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy*. *Science* 248(4951):73–76, 1990.
- [Dus06] E. DUSCH, N. VINCENT, A. GENOVESIO. *3D fluorescent spots detection in line-scanning confocal microscopy*. In *Proceedings - International Conference on Image Processing, ICIP*, 2006.
- [Edg69] R. F. EDGAR. *The Fresnel Diffraction Images of Periodic Structures*. *Optica Acta: International Journal of Optics* 16(No. 3):281–287, 1969.

- [For99] O. FORSTER. *Analysis 3*. Analysis. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, 1999.
- [For10] M. R. FOREMAN, P. TÖRÖK. *TUTORIAL REVIEW Computational methods in vectorial imaging*. Journal of Modern Optics 58(March):339–364, 2010.
- [Goo84] J. W. GOODMAN. *Statistical Optics*. Wiley Interscience, 1984.
- [Goo96] J. W. GOODMAN. *Introduction to Fourier Optics McGraw-Hill Series in Electrical and Computer Engineering*. Quantum and Semiclassical Optics Journal of the European Optical Society Part B 8(5):491, 1996.  
URL <http://stacks.iop.org/1355-5111/8/i=5/a=014?key=crossref.ad20ea108e8f625cb0486bf680f74198>
- [Gus00a] M. G. GUSTAFSSON. *Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy*. Journal of Microscopy 198(Pt 2):82–7, Mai 2000.  
URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10810003>
- [Gus00b] M. G. L. GUSTAFSSON, D. A. AGARD, J. W. SEDAT. *Doubling the lateral resolution of wide-field fluorescence microscopy using structured illumination*. Proc. SPIE 3919:141–150, 2000.
- [Gus05] M. G. L. GUSTAFSSON. *Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(37):13081–13086, September 2005.  
URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1201569>
- [Gus08] M. G. L. GUSTAFSSON, L. SHAO, P. M. CARLTON, C. J. R. WANG, I. N. GOLUBOVSKAYA, ET AL. *Three-Dimensional Resolution Doubling in Wide-Field Fluorescence Microscopy by Structured Illumination*. Biophysical Journal 94(June):4957–4970, 2008.
- [Haa07] S. HAASE. *OMX - A Novel High Speed and High Resolution Microscope and its Application to Nuclear and Chromosomal Structure Analysis*. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, 2007.  
URL <http://books.google.de/books?id=kx8NtwAACAAJ>

- [Hag12] N. HAGEN, L. GAO, T. S. TKACZYK. *Quantitative sectioning and noise analysis for structured illumination microscopy..* Optics express 20(1):403–13, Januar 2012.  
URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3336372&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [Hei99] HEINTZMANN, R., C. CREMER. *Laterally modulated excitation microscopy: Improvement of resolution by using a diffraction grating.* Proc. SPIE 3568, 1999.
- [Hei02] R. HEINTZMANN, T. M. JOVIN, C. CREMER. *Saturated patterned excitation microscopy—a concept for optical resolution improvement..* Journal of the Optical Society of America. A, Optics, image science, and vision 19(8):1599–609, August 2002.  
URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12152701>
- [Hei03] R. HEINTZMANN. *Saturated patterned excitation microscopy with two-dimensional excitation patterns.* Micron 34(6-7):283–291, Oktober 2003.  
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968432803000532>
- [Hei06a] R. HEINTZMANN. *Structured Illumination Methods.* In *Handbook of Confocal Microscopy*, Kapitel 13, Seiten 265–279. Springer Science + Business Media, LLC, 2006.
- [Hei06b] R. HEINTZMANN, P. A. BENEDETTI. *High-resolution image reconstruction in fluorescence microscopy with patterned excitation..* Applied optics 45(20):5037–45, Juli 2006.  
URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16807615>
- [Hel03] S. W. HELL. *Toward fluorescence nanoscopy.* Nature biotechnology 21(11):1347–1355, 2003.
- [Hig15] L. M. HIGGINS, M. ZEVON, V. GANAPATHY, Y. SHENG, M. C. TAN, ET AL. *Line-scanning confocal microscopy for high-resolution imaging of upconverting rare-earth-based contrast agents.* Journal of Biomedical Optics , 2015.
- [Hir09] L. M. HIRVONEN, K. WICKER, O. MANDULA, R. HEINTZMANN. *Structured illumination microscopy of a living cell.* Eur. Biophys. J. , 2009.
- [Ino90] S. INOUÉ. *Foundations of Confocal Scanned Imaging in Light Microscopy*, Seiten



- 1–14. Springer US, Boston, MA, 1990.  
URL [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-7133-9\\_1](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-7133-9_1)
- [Kne09] P. KNER, B. B. CHHUN, E. R. GRIFFIS, L. WINOTO, M. G. L. GUSTAFSSON. *Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination*. Nature Methods 6(5):339–342, 2009.
- [Kot33] V. A. KOTELNIKOV. *On the transmission capacity of the ‘ether’ and of cables in electrical communications*. Izd. Red. Upr. Swjasi RKKA , 1933.
- [Kou18] J. KOUWENBERG, G.-J. KREMERS, J. SLOTMAN, H. WOLTERBEEK, A. HOUTSMULLER, ET AL. *Alpha particle spectroscopy using FNTD and SIM super-resolution microscopy*. Journal of Microscopy 270(3):326–334, February 2018.
- [Kř10] P. KŘÍŽEK, G. M. HAGEN. *Spatial light modulators in fluorescence microscopy*. In *Microsc. Sci. Technol. Appl. Educ.*, 2010.
- [Lak06] J. R. LAKOWICZ. *Principles of fluorescence spectroscopy*, 2006.
- [Lal16] A. LAL, C. SHAN, P. XI. *Structured illumination microscopy image reconstruction algorithm*. CoRR abs/1602.06904, 2016.  
URL <http://arxiv.org/abs/1602.06904>
- [Lar11] B. LARSON, G. PETERSON, S. ABEYTUNGE, M. RAJADHYAKSHA. *Performance of line-scanning confocal microscopy in human skin: Investigation of potential for clinical translation*. In *Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE*, 2011.
- [Li15] D. LI, L. SHAO, B.-C. CHEN, X. ZHANG, M. ZHANG, ET AL. *Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics*. Science 349(6251):944–955, 2015.
- [Li16] D. LI, E. BETZIG. *Response to Comment on “Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics”*. Science 352(6285):527–527, 2016.  
URL <http://science.sciencemag.org/content/352/6285/527.2>
- [Lim08] D. LIM, K. K. CHU, J. MERTZ. *Wide-field fluorescence sectioning with hybrid speckle*

- and uniform-illumination microscopy*. Optics letters 33(16):1819–21, August 2008.  
URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18709098>
- [Luk63] LUKOSZ W. UND MARCHAND M. *Optischen Abbildung unter Überschreitung der beugungsbedingten Auflösungsgrenze*. Optica Acta: International Journal of Optics 10(3):15, 1963.  
URL <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/713817795>
- [Luk66] W. LUKOSZ. *Optical Systems with Resolving Powers Exceeding the Classical Limit*. Journal of the Optical Society of America 56(11):1463–1472, 1966.
- [LW16] H. W. LU-WALTHER, W. HOU, M. KIELHORN, Y. ARAI, T. NAGAI, ET AL. *Nonlinear structured illumination using a fluorescent protein activating at the readout wavelength*. PLoS One , 2016.
- [Man12] O. MANDULA, M. KIELHORN, K. WICKER, G. KRAMPERT, I. KLEPPE, ET AL. *Line scan-structured illumination microscopy super-resolution imaging in thick fluorescent samples..* Optics express 20(22):24167–24174, Oktober 2012.  
URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23187180>
- [Min61] M. MINSKY. *Microscopy Apparatus - US patent 3013467*, 1961.
- [Mor92] C. G. MORGAN. *1.patent\_struct.ill.pdf*, 1992.
- [Nei97] M. A. NEIL, R. JUSKAITIS, T. WILSON. *Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope..* Optics letters 22(24):1905–7, Dezember 1997.  
URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18188403>
- [Nei00] M. A. NEIL, A. SQUIRE, R. JUSKAITIS, P. I. BASTIAENS, T. WILSON. *Wide-field optically sectioning fluorescence microscopy with laser illumination..* Journal of Microscopy 197(Pt 1):1–4, Januar 2000.  
URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10620142>
- [Nie13] R. P. J. NIEUWENHUIZEN, K. A. LIDKE, M. BATES, D. L. PUIG, S. STALLINGA, ET AL. *Measuring image resolution in optical nanoscopy*. Nature Methods 10(6):557–562, 2013.

- [Nyq28] H. NYQUIST. *Certain Topics in Telegraph Transmission Theor-y*. Transactions of the AIEE 47:617–644, 1928.
- [O’H12] K. O’HOLLERAN, M. SHAW. *Polarization effects on contrast in structured illumination microscopy*. Optics Letters 37(22):4603–4605, 2012.
- [Rig13] C. H. RIGHOLT, J. A. SLOTMAN, I. T. YOUNG, L. J. V. VLIET, S. STALLINGA. *Image filtering in structured illumination microscopy using the Lukosz bound*. Optics Express 21(21):1599–1609, 2013.
- [Rot13] S. ROTH, C. J. SHEPPARD, K. WICKER, R. HEINTZMANN. *Optical photon reassignment microscopy (OPRA)*. Optical Nanoscopy 2(1):5, 2013.  
URL <http://optnano.springeropen.com/articles/10.1186/2192-2853-2-5>
- [Rus06] M. J. RUST, M. BATES, X. ZHUANG. *Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)*. Nature Methods 3(10):793–795, 2006.
- [Sax82] W. SAXTON, W. BAUMEISTER. *The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein*. Journal of Microscopy 127(2):127–138, 1982.
- [Sch08] P. SCHAFHEITLIN. *Die Theorie der Bessel Funktionen*. E. Jahnke, 1908.
- [Sch08] L. SCHERMELLEH, P. M. CARLTON, S. HAASE, L. SHAO, L. WINOTO, ET AL. *Subdiffraction Multicolor Imaging of the Nuclear Periphery with 3D Structured Illumination Microscopy*. Science 320(5881):1332–1336, 2008.
- [Sch12] J. J. SCHMIED, A. GIETL, P. HOLZMEISTER, C. FORTHMANN, C. STEINHAUER, ET AL. *Fluorescence and super-resolution standards based on DNA origami*. Nature Methods 9(12):1133–1134, 2012.  
URL <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2254>
- [Sch13] O. SCHULZ, C. PIEPER, M. CLEVER, J. PFAFF, A. RUHLANDT, ET AL. *Resolution doubling in fluorescence microscopy with confocal spinning-disk image scanning microscopy*, 2013.
- [Sch14] M. SCHROPP, R. UHL. *Two-dimensional structured illumination microscopy*. Journal of Microscopy 256(1):23–36, August 2014.

- URL <http://doi.wiley.com/10.1111/jmi.12154>
- [Sch17] M. SCHROPP, C. SEEBACHER, R. UHL. *XL-SIM: Extending Superresolution into Deeper Layers*. Photonics 4(2), 2017.  
URL <http://www.mdpi.com/2304-6732/4/2/33>
- [Sha04] N. C. SHANER, R. E. CAMPBELL, P. A. STEINBACH, B. N. G. GIEPMANS, A. E. PALMER, ET AL. *Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein*. Nat. Biotechnol. , 2004.
- [Sha11] L. SHAO, P. KNER, E. H. REGO, M. G. L. GUSTAFSSON. *Super-resolution 3D microscopy of live whole cells using structured illumination*. Nature Methods 8(12):1044–1046, 2011.
- [She13] C. J. R. SHEPPARD, S. B. MEHTA, R. HEINTZMANN. *Superresolution by image scanning microscopy using pixel reassignment*. Optics Letters 38(15):2889, 2013.  
URL <https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=ol-38-15-2889>
- [Shi62] O. SHIMOMURA, F. H. JOHNSON, Y. SAIGA. *Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea*. J. Cell. Comp. Physiol. , 1962.
- [Shr08] S. A. SHROFF, J. R. FIENUP, D. R. WILLIAMS. *OTF compensation in structured illumination superresolution images*. Proceedings of SPIE 7094:709402–709402–11, 2008.  
URL <http://link.aip.org/link/PSISDG/v7094/i1/p709402/s1&Agg=doi>
- [Sme14] D. SMEETS, Y. MARKAKI, V. J. SCHMID, F. KRAUS, A. TATTERMUSCH, ET AL. *Three-dimensional super-resolution microscopy of the inactive X chromosome territory reveals a collapse of its active nuclear compartment harboring distinct Xist RNA foci*. Epigenetics & Chromatin 7(8):1–27, 2014.
- [So01] P. T. C. SO, H.-S. KWON, C. Y. DONG. *Resolution enhancement in standing-wave total internal reflection microscopy: a point-spread-function engineering approach*. J. Opt. Soc. Am. A 18(11):2833–2845, Nov 2001.  
URL <http://josaa.osa.org/abstract.cfm?URI=josaa-18-11-2833>

- [Som08] M. G. SOMEKH, K. HSU, M. C. PITTER. *Resolution in structured illumination microscopy: a probabilistic approach*. J. Opt. Soc. Am. A 25(6):1319–1329, Jun 2008.  
URL <http://josaa.osa.org/abstract.cfm?URI=josaa-25-6-1319>
- [Sto52] G. G. STOKES. *On the Change of Refrangibility of Light*. Philos. Trans. R. Soc. London , 1852.
- [Sto69] P. A. STOKSETH. *Properties of a Defocused Optical System*. Journal of the Optical Society of America 59(10):1314, Oktober 1969.  
URL <http://www.opticsinfobase.org/abstract.cfm?URI=josa-59-10-1314>
- [Tsi88] R. Y. TSIEN. *Fluorescence measurement and photochemical manipulation of cytosolic free calcium*, 1988.
- [Tsi89] R. Y. TSIEN. *Fluorescent probes of cell signaling*.. Annu. Rev. Neurosci. , 1989.
- [Ven07] C. VENTALON, R. HEINTZMANN, J. MERTZ. *Dynamic speckle illumination microscopy with wavelet prefiltering*.. Optics letters 32(11):1417–9, Juni 2007.  
URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17546140>
- [War05] W. W. WARD. *Biochemical and Physical Properties of Green Fluorescent Protein*. In *Green Fluoresc. Protein*, 2005.
- [Wei08] A. WEIGEL. *Quantitation Strategies in Optically Sectioning Fluorescence Microscopy*. Dissertation, Georg August Universität Göttingen, Fakultät für Biologie, Dezember 2008.
- [Wic13] K. WICKER, O. MANDULA, G. BEST, R. FIOLKA, R. HEINTZMANN, ET AL. *Phase optimisation for structured illumination microscopy*. Opt. Express 21(2), 2013.
- [Wil11] T. WILSON. *Optical sectioning in fluorescence microscopy*. Journal of Microscopy 242(2):111–116, Mai 2011.  
URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21118248>
- [Xi02] P. XI, C. ZHOU, E. DAI, L. LIU. *Generation of near-field hexagonal array illumination with a phase grating*.. Optics letters 27(4):228–30, Februar 2002.  
URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18007762>

- [Zin98] W. ZINTH, H.-J. KÖRNER. *Optik, Quantenphänomene und Aufbau der Atome*, Kapitel 4, Seite 103. Oldenbourg Verlag, 1998.

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Sehr herzlich möchte ich Prof. Dr. Ralf Jungmann dafür danken, dass er die Betreuung dieser Arbeit übernommen hat. Mein besonderer Dank gilt ausserdem Prof. Dr. Rainer Uhl für die intensive Betreuung dieser Arbeit und für zahlreiche hilfreiche Anregungen. Ohne ihn, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Desweiteren möchte ich ganz besonders Dr. Christian Seebacher für viele fruchtbare Gespräche und die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Experimente danken. Ausserdem möchte ich mich an dieser Stelle auch bei Prof. Dr. Wolfgang Zinth für viele hilfreiche Anregungen bedanken.

Ein besonderer Dank gilt ausserdem meinen Kollegen Dr. Andreas Deeg, Alexander Hildebrand, Kai Sparenberg, Nicolai Pechstein, und Dr. Thomas Naiser für viele hilfreiche Gespräche und Hinweise. Ebenfalls möchte ich mich noch besonders bei meinen Kollegen Ruppert Schick, Christoph Pohl, Dr. Stefan Laimgruber, Dr. Carolina Glas und Martin Tosstorff für diverse Hilfe bei den Experimenten und beim Erstellen der Arbeit bedanken. Für die Unterstützung mit den Messungen am OMX danke ich sehr herzlich Andreas Maiser, Dr. Hartmann Harz und Dr. Jürgen Neumann.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern Johann und Eveline Schropp bedanken, die mein Studium und damit meinen beruflichen Werdegang durch ihre Unterstützung möglich gemacht haben und stets ein offenes Ohr für meine Sorgen hatten.

